



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Química Agrícola

TESIS DOCTORAL

**Selección de plantas y enmiendas para
la recuperación de suelos de mina
contaminados con arsénico y metales pesados**

**Plant and amendment selection for
multicontaminated mine soil recovery**

**Rebeca Manzano Gutiérrez
Madrid 2013**

DIRECTORES: Dr. Jesús Peñalosa Olivares y Dra. Elvira Fernández Esteban



D. JESÚS MANUEL PEÑALOSA OLIVARES, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y DÑA. ELVIRA ESTEBAN FERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CERTIFICAN:

Que Dña. Rebeca Manzano Gutiérrez ha realizado bajo nuestra dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título “Selección de plantas y enmiendas para la recuperación de suelos de mina contaminados con arsénico y metales pesados” que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid, a 3 de Septiembre de 2013.

Fdo: D. Jesús M. Peñalosa Olivares

Fdo: Dña. Elvira Esteban Fernández

FINANCIACIÓN – FUNDINGS

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

Evaluación del impacto ambiental y recuperación del medio natural en emplazamientos contaminados (EIADES). CM, S-0505/AMB/000296. 2006-2009; CM, S2009/AMB-1478. 2010-2013.

Actuación combinada de fitoextracción, fitoestabilización y revegetación de suelos contaminados por residuos mineros (ACOFI). 2007-2009. MEC-CTM 2007-66401-CO2-02.

Fitoestabilización asistida de emplazamientos contaminados por elementos traza: selección de la combinación planta-enmienda adecuada para cada escenario (COMFITES). 2011-2013. CTM 2010-21922-CO2-02.

This PhD document has been financed by the following research projects:

Evaluation of environmental impact and site recovery of contaminated environments (EIADES). CM, S-0505/AMB/000296. 2006-2009; CM, S2009/AMB-1478. 2010-2013.

Combination of phytoextraction, phytostabilisation and revegetation for mine spill contaminated soils. 2007-2009. MEC-CTM 2007-66401-CO2-02.

Assisted phytostabilisation of trace element-contaminated sites: Selection of plant-amendment combination for each scenario. 2011-2013. CTM2010-21922-CO2-02.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS- PUBLICATIONS

Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J. M., Manzano, R., Carpena-Ruiz, R. O., Gamarra, R., & Esteban, E. (2009). Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *Journal of Hazardous Materials*, 162, 854–859.

Moreno-Jiménez, E., Manzano, R., Esteban, E., & Peñalosa, J. (2010). The fate of arsenic in soils adjacent to an old mine site (Bustarviejo, Spain): mobility and transfer to native flora. *Journal of Soils and Sediments*, 301–312.

Manzano, R., Peñalosa, J. M., & Esteban, E. (2013). Arsenic Accumulation and Tolerance of *Cytisus scoparius* Under Controlled Conditions. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(1), 1363. doi:10.1007/s11270-012-1363-6

Las publicaciones derivadas de los Capítulos IV.2 y IV.3 han sido enviados a revistas de investigación:

Publications derived from Chapters IV.2 and IV.3 are currently sent to research journals:

Manzano, R., Peñalosa, J. M., & Esteban, E. Amendment application in a multicontaminated mine soil: Effects on trace element mobility.

Manzano, R., Esteban, E., Peñalosa, J. M., & Alvarenga, P. Amendment application in a multicontaminated mine soil: Effects on soil ecotoxicological characteristics.

Las publicaciones derivadas del Capítulo IV.1 están actualmente en la fase de elaboración.

Publications derived from chapter IV.1 are currently under preparation.

Agradecimientos

Han pasado unos cuantos años desde que empecé a realizar mi tesis doctoral y más desde que comencé mi andadura en el mundo de la investigación. A lo largo de este tiempo he conocido a gente dentro y fuera del laboratorio, a los que tengo que agradecer los buenos momentos que he pasado con ellos. A las personas que me han rodeado en el día a día en el departamento y que sin duda han hecho de estos años muy especiales para mí, con sus cosas buenas y no tan buenas como en todo, pero tan especiales que no me gustaría que acabaran aquí; y las personas de fuera, amigos y familia, los que siempre estarán ahí con su apoyo incondicional. A todos ellos les tengo que agradecer inmensamente por estar a mi lado.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis dos directores de tesis, la Dra. Elvira Esteban y el Dr. Jesus Peñalosa, por confiar en mí desde que llegué al departamento para hacer el proyecto fin de carrera, pasando por la tesis de master hasta llegar a este momento. Por su supervisión, apoyo y cariño durante todos estos años y sobre todo en los momentos más angustiosos que he tenido en este último año. Porque siempre han sido más que dos directores de tesis, siempre cercanos a mí con sus palabras de ánimo.

A la Dra. Pilar Zornoza, al Profesor Ramón Carpena y al Dr. Roberto Gamarra, siempre amables y dispuestos ayudarme en lo que fuera necesario. A los otros profesores del departamento, siempre con su energía y su ilusión. A las personas que me han acompañado durante todo este tiempo en el laboratorio desde que llegué al antiguo 101, todos los estudiantes de proyectos de fin de carrera y tesis de master que han pasado por nuestro laboratorio y que han aportado frescura a los que ya estábamos allí. Especialmente cuando entré por primera vez en el departamento y que siempre daba un poco de “miedo” comenzar algo nuevo, ahí estaban Saúl y Edu, de los que aprendí a hacer muchas de las cosas que continuo haciendo ahora. Luego llegó Cristina, nos apoyamos mutuamente durante nuestras tesis de master y además animaba muy bien el laboratorio con sus cantares. En ese periodo y en adelante fue donde conocí mejor a los chicos del 202, Sandra, Paloma, Diana, Diego, Patri, Elena, Jaime; a mi vecino de al lado, Iván; mi compi del master y del grupo de quedar, Cova; mi compañera y amiga de ambientales, del master, de casa, de viajes y aventuras por tierras lejanas, Ana. A Bea, por su ayuda, por los buenos momentos tanto dentro como fuera del laboratorio. A los que vienen y se van del laboratorio, pero que siempre los recordaré. Los de este último año, Aoife, Mariana, Pedro con el que me he reído muchísimo y me gustaría que se quedase por más tiempo. A los de ahora que estamos juntos en el despacho: Carlos mi compañero de piscina, nos vamos dando aliento

cuando uno no quiere ir; grupo quelato, Teresa, Clara, Sheila, Virginia. Y muy especialmente a la que sin duda me ha tenido que aguantar más, a Teresa, la mejor compañera de laboratorio que he podido tener, por todo su ayuda, apoyo, comprensión y amistad, porque sin duda mi vida en el laboratorio habría sido muy diferente y menos fácil sin ella. Porque me ha aportado racionalidad en los momentos de más confusión y crispación y siempre he podido contar con ella.

Aunque muchos de ellos ya han dejado de trabajar conmigo y algunos se han ido lejos siempre hay un huequcito para quedar y charlar, como si no hubieran pasado los años y estuviéramos otra vez juntos en las comidas diarias en las que toda la gente de todos los laboratorios nos reuníamos, momentos que siempre recordaré.

A la Dra. Paula Alvarenga y la Dra. Patricia Palma de la Escuela Superior Agraria del Instituto Politécnico de Beja en Portugal. Tengo que agradecerles que mi estancia allí fuera de lo más agradable, siempre ayudándome en todo lo que necesitaba y preocupándose por mí. Sobre todo a Paula, porque ya mostró su cariño antes de conocerme y me aceptó en su grupo, me enseñó a hacer toda la parte de ecotoxicología de la que no sabía nada, siempre sacaba tiempo para saber cómo iba el trabajo y con la que pasé muy buenos ratos con ella y con su familia. A las chicas del laboratorio de abajo, con las que siempre pasaba buenos ratos en las comidas, las que convertí prácticamente en clases de español-portugués.

Al Profesor Andrew A. Meharg por aceptarme en su grupo de trabajo en la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aberdeen en Reino Unido, abrirme las puertas de su laboratorio y trabajar en uno de los mejores grupos de investigación. A Claire Deacon, por su inmensa ayuda en el laboratorio y al personal de la universidad que también me ayudaron a hacer mis análisis. A todas las personas que conocí en Aberdeen y que pusieron color a la ciudad gris, especialmente a Andria, Alessio, Luke, Irene, Reem. La vida allí no hubiera sido igual sin ellos.

A mis compis de ambientales, que están desperdigadas por el mundo, pero que tuve la gran suerte de conocer durante los primeros días de clase y desde ese momento ya no nos separamos: Ana cooperando por el mundo de un lado para otro, Leti que pone a punto las aguas de Talavera y Matilde, a la que echo mucho de menos y desde la distancia siempre me ha recordado que hay que ser positiva y tirar hacia adelante! A mis otras amigas que también están lejos, Mónica, que ya se fue hace mucho, con la que me une una gran amistad desde el colegio, pasan los años y nunca se pierde la confianza. A mi amiga Roberta, que aunque nos tenemos que comunicar en otro idioma a veces no hace falta ni hablar para saber lo que estamos pensando.

A mi amiga Mónica, la cual admiro muchísimo por su esfuerzo, dedicación, trabajo y positividad. Por todos los buenos momentos, por los viajes que nos hemos hecho juntas y por los que haremos, por estar siempre a mi lado también aportando una sonrisa, y por endulzarme los viernes con brownies, crepes y tortitas por supuesto!

A Marisa y Susana. Por todos los años de amistad que son unos cuantos! Por todos los buenos momentos, por los ánimos, sobre todo este último año! Qué más puedo decir de mis dos amigas incondicionales, que van pasando los años y ahí seguimos, con nuestros compromisos pero siempre juntas.

A mis tíos y primos, especialmente a mi tía Mari Carmen, la mejor tía que se pueda tener, siempre aportando positividad, actividad, alegría y optimismo.

A mi perrita Linda, que ha pasado la mitad de mi vida conmigo, que se dice pronto. Ella era un miembro más de nuestra familia, siempre achuchándola y haciéndola de rabiar. Por sus horas de compañía y cariño, ni ella supo la función tan importante que llegó a hacer.

A los que ya no están, mis abuelos. Mis abuelos maternos que tanto tiempo pasaron conmigo en Madrid y la casa está llena de sus recuerdos; y mis abuelos paternos, siempre me vienen imágenes a la cabeza sentada en el banco de fuera de su casa su casa con las rosas de la entrada y las calas en el jardín. De todos ellos me acuerdo y estoy segura que se sentirían orgullosos de su nieta.

A mis padres. No sería la persona que soy ahora sin ellos, por todo lo que me han ayudado, por apoyarme en todas mis decisiones, por estar a mi lado en mis momentos más angustiosos, por ayudarme en este último año, sin ellos no hubiera conseguido nada de lo que tengo ahora y se lo debo todo.

Espero no dejarme a nadie importante fuera de esta lista de agradecimientos. Aunque siempre me ha sido difícil expresar con palabras y gestos mis sentimientos, a todos os quiero decir que os estoy muy agradecida de que hayáis compartido conmigo un trocito de vuestras vidas durante estos últimos años.

A mis padres

ABSTRACT

Arsenic (As) is a widespread contaminant in the environment, mining activities being one of the main anthropogenic sources. Arsenic also occurs naturally in soils due to the weathering and oxidation of underlying parent rock and volcanic emissions. Soils affected by anthropogenic activities may promote higher As and metal levels than those found in other environments. Mining processes such as pyrite roasting may produce metal-contaminated wastes containing not only As, but other trace elements as well. Some trace elements are associated with As in sulphides or oxides, such as Zn and Cd which both have a high affinity to form complexes with S. The reclamation of environments containing higher levels of trace elements has generated a great deal of attention over the last two decades. Organisms exposed to As may experience toxic effects and As is a known carcinogen. Arsenic toxicity depends on its speciation, organic compounds are generally less toxic than inorganic species and trivalent arsenic is more rapidly absorbed in biological systems than pentavalent arsenic. As(III) has a high affinity for sulfhydryl groups in proteins causing the deactivation of enzymes.

The main aim of this thesis is to study the remediation of mining polluted sites using plant and amendment-based technologies and to assess the ability of these technologies to reduce the mobility of arsenic and metals in soils and to limit their transfer to other environmental compartments. This work has been carried out in the surroundings of the Mónica mine, located in the municipality of Bustarviejo (Madrid, Spain). The main minerals found are arsenopyrite and matildite; matildite is a sulphide mineral containing bismuth and silver and is attached to the arsenopyrite in the form of small grains. Silver was extracted from the site from the 17th century to the 1980s. Mónica mine is in a high valley with two streams passing through it. Tailing dumps were established on the slopes above the stream banks, using the natural depression of the two rivers, so contamination may reach water bodies through soil erosion and contamination dispersion.

To accomplish this aim, the thesis is divided into three parts:

I. Evaluation of native plant species for phytoremediation purposes in mine soils.

Experiments were carried out using hydroponics and mesocosms in pots in order to correctly evaluate plant responses to arsenic exposure comparing different growth media.

1.1 Dose-response assays under controlled conditions with woody plants exposed to arsenic.

Salix atrocinerea and *Cytisus scoparius* are the two woody plant species used in this experiment together with a high biomass crop, *Hibiscus cannabinus*.

The aim of this experiment is to evaluate plant species excluder or accumulator behaviour under arsenate exposure. The influence of phosphate on arsenate uptake by these plants was also studied. Bioindicators were used to assess their resistance to As.

One year old *C. scoparius* and *S. atrocinerea* plants were obtained from a nursery and *H. cannabinus* was planted from seed. One plant per pot was transferred to containers with perlite and placed in a greenhouse for 8 weeks. Nutrient solution was added to the base of the containers and it flowed up through the container by capillarity. Three As treatments were applied: 0, 50 and 250 μM As, added as $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Arsenic and phosphorus concentrations were analytically determined in shoots and roots. Chlorophylls, malondyaldehyde (MDA), glutathione (GSH), and phytochelatins (PCs) were analysed as stress indicators in the fresh material.

To determine the regulation of arsenate uptake by phosphate, kinetics of arsenate absorption were studied with young roots of *S. atrocinerea*, *C. scoparius* and *H. cannabinus*. Plants were grown in hydroponics with phosphate (1 mM KH_2PO_4) and without phosphate under controlled conditions, eight weeks for the woody plants and two weeks for *H. cannabinus*. The short-term influx of arsenate was performed by incubation of excised roots in arsenate solutions with 5, 10, 20, 50, 100 or 200 μM As, added as $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, at room temperature. Several parameters were calculated: the maximum influx achieved by the uptake system at saturated substrate concentrations (V_{max}) and the Michaelis constant K_m (the substrate concentration at which half V_{max} is reached).

There were no significant differences in the biomass of *S. atrocinerea* exposed to arsenic compared to the control but both shoot and root growth of *C. scoparius* declined with the arsenic dose. *H. cannabinus* experienced the largest reduction in its biomass yield and toxic visual symptoms were observed.

The three plant species accumulated arsenic mainly in roots in the same order of magnitude, but accumulation was an order of magnitude higher in *S. atrocinerea* due to the

larger biomass yield. The shoot to root ratio for As was well below one, indicating that these species are As excluders. Consequently, these plant species are not advised for use in phytoextraction but may be suitable for use in phytostabilisation.

Kinetics of arsenate uptake showed arsenate absorption was regulated by phosphate. Arsenate influx was higher for P-starved plants. Furthermore, K_m values in –P plants were lower than in +P plants, showing that membrane transporters had a higher affinity for arsenate when grown without phosphorous.

Regarding stress indicators, there were no changes in MDA concentration among treatments. Chlorophyll concentration was only reduced in leaves of *C. scoparius*, but the ratio chlorophyll a/chlorophyll b was lower with the highest dose of arsenate for the two woody plant species, indicating that the photosynthetic system may be impaired under prolonged exposure times. Synthesis of GSH is important since it is a molecule that can cope with oxidative stress. Total thiol groups for *H. cannabinus* increased with the arsenate dose. In *C. scoparius*, GSH and PCs were analysed. In shoots there were no significant differences in GSH concentration among treatments and PCs were found only under arsenate exposure. In roots GSH concentration was two-fold higher in the treatments with arsenic. PC2, PC3 and PC4 were observed under arsenic exposure and only PC2 in the control. With the 250 μ M As dose, PCs synthesis increased significantly with respect 50 μ M As, without a significant decrease in GSH. Those observations support that thiol groups are detoxification mechanisms in response to As exposure.

Root capacity to accumulate As, resistance to high levels of arsenate, low stress and evidence of detoxification mechanisms indicate that phytostabilisation in As-mine soils using woody plants, such as *S. atrocinerea* and *C. scoparius*, is a promising phytotechnology.

1.2 Experiments in mesocosms with multi-contaminated soils and soils spiked with arsenic

Salix atrocinerea and *C. scoparius* were used in a short-term experiment in pots filled with arsenopyritic material and in experiments with soils spiked with arsenate. In this latter experiment, *Cynara cardunculus*, a high biomass crop, was also included.

The aims were to study plant species survival in multi-contaminated soils and soils spiked with arsenic, to evaluate the influence of plant species on trace element availability in soils and to assess the fractionation of arsenic in soils.

1.2.1. Experiments with soils spiked with arsenic

Salix atrocinerea, *C. scoparius* and *C. cardunculus* were planted in 5L pots containing 60% (w/w) of uncontaminated soil from the surroundings of the Mónica mina and 40% (w/w) of gravel. Soils were contaminated with two doses of arsenate added as $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (D30) and $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (D90). Rhizon samplers (Eijkelkamp, 10 cm long, \varnothing 2.5 mm) were inserted into the pots. Pots were left to equilibrate for one month, and afterwards one year old plants of *S. atrocinerea* and *C. scoparius* and one seedling per pot of *C. cardunculus* (previously germinated) were planted. One control for each As dose without plants was included. Soluble (in pore water) and extractable (with ammonium sulphate) arsenic were analysed. Arsenic was also analysed in the shoots and roots of the three plant species.

Results indicated that plant species did not have a significant influence on soil and pore water pH, finding only a slight reduction in soils planted with *S. atrocinerea*. Arsenic concentration in pore water was larger for the higher As dose. In this higher dose, As concentration in pore water was reduced in pots planted with *C. scoparius*. Arsenic fractionation in both spiked and naturally contaminated soils showed the amorphous hydrous oxide bound and crystalline hydrous oxide bound were the fractions containing the larger percentage of As. Plants did not influence arsenic fractionation in any of the samplings, and there were no differences between planted and unplanted pots. Arsenic distribution between fractions did not change over time.

Shoot biomass was not significantly affected as arsenic dose increased. Shoots of *C. cardunculus* was reduced in comparison to woody plants, but its root biomass yield did not decrease and was the highest among the three species. However, visual symptoms of toxicity were observed in *C. cardunculus*. As accumulation was higher in roots than in shoots, and *S. atrocinerea* registered the highest levels of arsenic.

1.2.1. Experiments with multi-contaminated soil

Two treatments were tested:

- 5L pots containing uncontaminated soil from the surroundings of the Mónica mine (2/3 w/w) and gravel (1/3 w/w) with one plant per pot of *Salix atrocinerea* and *C. scoparius*. Also, pots without plants were included (NC).
- 5L pots filled with 1/3 (w/w) of uncontaminated soil from the surroundings of the Mónica mine, 1/3 (w/w) of material from the tailing dumps and 1/3 of gravel (w/w). Pots were planted with one plant per pot of *S. atrocinerea* and *C. scoparius* together with unplanted pots (NC+E).

The experiment was run for four months. Total and extractable trace elements in soils and total concentration in plant tissues were analysed. Arsenic fractionation was performed as in the previous assay.

Total As concentration in NC+E was very high, exceeding the maximum concentration established by city authorities at the *Comunidad de Madrid*, 24 mg As·kg⁻¹. Total Cd and Cu concentration were also higher than the limit allowed (3 and 80 mg·kg⁻¹). Total Mn and Zn concentration did not exceed the limit but were close to them (690 and 11,700 mg·kg⁻¹). There were hardly differences in the extractable trace element concentrations between pots with plants and without plants, except in pots grown with *C. scoparius* where extractable As was reduced compared to unplanted pots and pots with *S. atrocinerea*. Arsenic fractionation revealed that non-specifically bound and specifically bound fractions contained the lowest proportion of As. Furthermore, extractable metal concentrations in NC+E with respect to the total were very low, Mn being the element with the highest extractability.

Biomass yield of *S. atrocinerea* was higher than *C. scoparius*, despite the biomass decrease of *Salix* in the NC+E treatment. Arsenic accumulation was higher in *S. atrocinerea*. Furthermore, Cd concentration was detected in shoots of *S. atrocinerea*, showing a shoot-root transfer factor equal to 0.8.

***Salix atrocinerea* and *C. scoparius* were demonstrated to tolerate As and metals. Arsenic availability was only reduced in pots grown with *C. scoparius*, so that a further support should be required in order to significantly reduce trace elements mobilisation. Consequently, soil amendments were tested in subsequent experiments.**

II. Amendment application in a multi-contaminated mine soil: Effects on trace element mobility

Several amendments were tested in soils contaminated with arsenopyritic material with the aim of reducing trace element mobilisation, particularly arsenic, the most toxic trace element found on the site. To test the efficacy of the selected amendments, three experiments were carried out:

II.1 Arsenic and heavy metal mobility in amended soils evaluated by long-term leaching tests

Uncontaminated soil plus dumping material from Mónica mine were mixed in a 60:40 proportion (w/w). The amendments were previously added to the mixture before column filling. The treatments were (treatment codes in brackets):

Unamended (Control)

FeSO₄ 1% w/w ('Fe')

CaCO₃ 1% w/w ('Ca')

FeSO₄ 1% w/w + CaCO₃ 1% w/w ('Fe+Ca')

Paper mill 1% w/w ('RP')

FeSO₄ 1% w/w + paper mill 1% w/w ('Fe+RP')

Green waste compost 3% w/w ('GWC')

Columns (Pharmacia Biotech, 30 cm long, 5 cm internal diameter) were filled with 800g of the mixtures. Columns were leached upwards from their base with deionised water at a 0.3 ml·min⁻¹ continuous flow maintained by a peristaltic pump. Eight fraction series over 32 days were collected, 13.5 L being the total water volume passed through the columns. Before leachate collection commenced, soils were fully saturated. Arsenic and metals were analysed in the leachates together with pH, CE and dissolved organic carbon (DOC). Arsenic speciation was analysed in some of the treatments.

The overall aim of this test is to simulate leaching over a long term period. Amendments were tested in order to assess the durability of their effect as immobilising agents of trace elements. The challenge is focused on the reduction of the soluble fraction of both arsenic and metals, due to their different chemical properties.

Unamended soils registered a low pH due to arsenopyrite oxidation. Leachate pH was lower in 'Fe' treatment compared to the other treatments, favoured by the reaction of ferric ions with water. 'Fe+Ca', 'Ca' and 'RP' increased leachate pH above 7. 'Fe+RP' contributed to increase the pH above that of the control. As electric conductivity decreased and soluble Fe was depleted from soils, pH increased and became steady at levels of 7 favoured by the liming effect of the paper mill.

The cumulative concentration of trace elements in leachates was represented versus the cumulative volume. Points were fit to Michaelis Menten hyperbolas for metals, and exponential growth functions for As. The functions indicated the differences between metals and arsenic leaching, showing the depletion of metals from soils and the persistence of As leaching over time.

The cumulative As concentration was reduced efficiently in the 'Fe' treatment but metals leached more than the control. 'Ca' and 'RP' increased arsenic concentrations, whilst reducing metal total cumulative concentrations due to the liming effect. 'Fe+RP' and 'Fe+Ca' were efficient to reduce arsenic at short term but increased As leaching at long term compared to the unamended treatment. In 'Fe+RP' the effect of the iron oxihydroxides formed was observed from the first fractions of leachates, but as pH increased so did As concentration. In 'Fe+Ca' the extent of this effect was briefer, due to the pH steadiness above 7 observed since the beginning of leaching. Mathematically, fitting was accomplished using two exponential growth functions, one for the short term leaching and the other one for the long term leaching. In these 'Fe+RP' and 'Fe+Ca' treatments, the necessity to monitor pH and to incorporate additional iron-bearing materials are clearly demonstrated. Both treatments reduced the total cumulative metal concentration compared to the control with the exception of Mn. The treatment with compost 'GWC' increased largely As leaching. DOC and pH changes were not enough to explain the large amount of As leached. Speciation analyses showed that As(V) was the predominant arsenic species found in the leachates in the control, but in the 'GWC' treatment As(III) was the predominant one. Its higher solubility may explain the great increase of labile As.

Iron sulphate helps to retain As in soils efficiently but contributes to metal leaching. Despite the high concentration of iron present naturally in the tailings, incorporating an additional source of iron promotes the neoformation of iron minerals. Since iron sulphate can lower pH, materials able to increase pH and reduce metal leaching are essential to mix with iron-bearing ameliorants. 'Fe+RP' and 'Fe+Ca' were the most promising amendments to retain arsenic in the short term. In the long term and in field conditions, new supplies of iron sulphate or other sources of iron after the first incorporation is required. In addition, arsenic solubility increases as pH increases within the pH ranges commonly found in soils, so pH monitoring is essential in order to maintain pH levels below the optimal arsenic solubility range.

II.2 Mesocosm assays using amendments and plants

The treatments were the same used in the previous experiment. Pots (2 L) were filled with 2 kg of the mixture. They were left to equilibrate for one month at 70% water holding capacity and then were divided in two sections. 100 seeds of *Arrhenatherum elatius* subsp. *Bulbosum* and 100 seeds of *Festuca curvifolia* were sown in each half of the pot. Both plants present

fasciculate roots that spread over the surface assisting soil stabilisation. They also form fairly dense shoot bunches. The experiment ran for five weeks. Trace element lability in pore water was monitored using Rhizon samplers (Eijkelkamp, 10 cm long, \varnothing 2.5 mm).

The aim of this experiment was to select the most appropriate materials to reduce trace element mobilisation in soils containing arsenopyritic materials (from the tailing dumps in the Mónica mine) and the creation of a favourable growth environment for the vegetation establishment.

The lowest pH values were observed with the incorporation of iron sulphate alone, while 'Ca', 'Fe+Ca' and 'RP' treatments showed the highest pH values. Pore water from the combination of iron sulphate with paper mill ('Fe+RP') presented similar pH values to those in the unamended soils.

The treatments 'Fe' and 'Fe+RP' limited arsenic but increased metal mobilisation. However, ferrous sulphate in combination with calcium carbonate was effective in reducing both arsenic and metals in pore water. The single incorporation of paper mill or CaCO_3 significantly increased As concentration in pore water. Both amendments efficiently reduced Mn and Zn concentration compared to the unamended control. All amendments had a negligible effect on the reduction of Cu pore water concentration.

Seeds germinated properly and the majority of seedlings grew satisfactorily excepting those in 'Fe' treatment, where seed germination percentage was very low and the seedlings died some days after emergence. Plant biomass of both grass species, *A. elatius* and *F. curvifolia*, was a sensitive indicator of the comparative efficiency of the amendments. *Arrhenaterum elatius* fresh weight was higher than *F. Curvifolia*'s on average at the end of the experiment. *A. elatius* grew rapidly whereas *F. curvifolia* growth rate was lower and its spreading over the soil surface was smaller. In both species, the lowest fresh weight was recorded in the unamended treatment, while the highest fresh biomass was found with 'Ca', 'Fe+Ca' and 'RP'.

Amendments effectively to reduce As concentration in the aerial part of both species, except in 'Ca' treatment where there were no significant differences compared to the unamended treatment.

Column leaching provided information of trace elements mobility in the short and long term; the short term dataset was analogous to those obtained with pore water extractions. This confirms that pore water sampling in field conditions is a valid methodology that helps to

evaluate changes in trace element solubility and is useful to monitor ecological risks associated with trace element lability.

'Fe+Ca' and 'Fe+RP' treatments would be the most suitable amendment in reducing As and metal mobility. They also promoted plant growth and provided the most favourable conditions for vegetation establishment.

III.3 Macrocossms assays using amendments and plants

Arrhenatherum elatius subsp. *Bulbosum* and *Festuca curvifolia* were used in large containers (140x60x40 cm, capacity 200 L) filled with 80:20 mixture of uncontaminated soil and contaminated material from the tailing dump of Mónica mine in Bustarviejo. Amendments were incorporated into the soil and the treatments were:

unamended (Control)

Paper mill 1% w/w ('RP')

FeSO₄ 1% w/w + paper mill 1% w/w ('Fe+RP')

Green waste compost 3% w/w ('Cmp')

FeSO₄ 1% w/w + compost 3% w/w ('Fe+Cmp')

The aims were similar to those of the previous experiment, at a larger scale and a closer approximation to field scenarios. Trace element mobility at two different depths was also evaluated.

Amendments were added on the surface and hand-mixed with the soil. Five seedlings of *A. elatius* and *F. curvifolia* were planted in each container. Because of the high amount of As leached in the column experiment, a new compost with a lower pH was used this time, as adding organic matter to the mine soils could improve plant development. Plastic sheets (26x62x2 cm) were placed in the front part of each container. Six drillings were punched, three close to the soil surface (A) and three 10 cm below and in parallel to the previous ones (B). Rhizon samplers (Eijkelkamp, 10 cm long, Ø 2.5 mm) were inserted in each drilling to collect pore water. Arsenic and metals were analysed in pore water extracts. 0.1 M ammonium sulphate was used to determine trace element extractability. Plants were grown for nine months. After that, they were sampled and mineralised.

Arsenic extracted with ammonium sulphate showed 'Fe+Cmp' was the most efficient amendment in reducing the extractable As, but it increased with compost only. 'Fe+RP' was also a good combination for As retention, while 'RP' was the worst. There were not found other As species than arsenate, so arsenite mobilisation did not contribute to the large extractable As. Dissolved organic carbon could be mobilised together with arsenic, favouring its larger solubility. There were significant differences between the two depths of pore water collection. Arsenic concentration was higher at depth than at the surface. Compost in combination with ferrous sulphate ('Fe+Cmp') increased extractable Cu, Mn, Zn and Fe concentration more than the other treatments. Soil pH in 'Fe+Cmp' can have contributed to the extractability of those metals. However, compost singly reduced Zn concentration compared to the control probably due to the formation of complexes with organic matter. Arsenic and Mn concentration in pore water correlated well with the extractable fraction of both elements, so both extraction procedures can be performed in order to predict the most available fraction of elements for plants.

Growth pattern resembled the pot experiment. *Arrhenaterum elatius* fresh weight was higher than that of *F. curvifolia* on average and formed dense stem clusters. 'Fe+Cmp' and 'Cmp' were the treatments which contributed further to both plant species growth. Both plant species grown in combination for revegetation of mining polluted sites is a good option, since both coexist in the mine area and both have fasciculate roots to fix soil. Arsenic concentration in shoots of *A. elatius* was positively correlated with extractable and soluble As. Principal Component Analysis (PCA) showed 'Fe+Cmp' contributed most to increase As absorption in *F. curvifolia*, but it was negatively correlated to As concentration in shoots of *A. elatius*. Although some studies have described *A. elatius* as Cd and Zn extractor, Cd was not found in its tissues and shoot to root transfer factor for Zn is not enough to consider *A. elatius* as a Zn phytoextractor.

The single application of ferrous sulphate, compost or paper mill were discarded as a enhanced phytoremediation option. Ferrous sulphate lowers pH and paper mill waste and compost applied alone can lead to large increases in labile As. Iron-bearing materials together with paper mill waste or compost, but mainly in combination with compost, have been found to reduce As leaching and increase biomass yield more compared to compared to the other treatments tested.

III. Amendment application in a multi-contaminated mine soil: effects on soil enzymatic activities and ecotoxicological assays.

In order to assess the success of the remediation process, a series of ecotoxicological assays were performed to complement the chemical analyses previously described.

Soil enzymatic activities (dehydrogenase, β -glucosidase, acid phosphatase, urease, protease and cellulase), *Eisenia fetida* mortality and avoidance behaviour (terrestrial organisms) *Daphnia magna* immobilisation and *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition (aquatic organisms using soil leachates) were measured in soils at the end of experiment in II.2.

Dehydrogenase activity is an indicator of the average activity of soil microbial populations. It was positively affected by all treatments apart from the iron sulphate only treatment and the control (unamended treatment). PCA was performed to determine the relationship among the following parameters: enzymatic activities, plant biomass (*A. elatius* and *F. curvifolia*), soil pH, extractable As and metals and available P and K. PCA showed that the iron sulphate and paper mill treatment increased the activities of acid phosphatase, urease and cellulase compared to the iron sulphate only treatment. However, there were no clear effects of soil pH, metals and As extractability on enzymatic activity because those chemical parameters and enzymatic activities were correlated with different components in the PCA results derived. Consequently, these results suggest that enzymatic activities provide limited information about the effects of contaminants on soil health. From the results, considering that dehydrogenase activity showed the best positive correlation with plant growth and some soil nutrients such as available P and K, together with its relationship with trace element concentration, it could be selected as a good indicator of improvement in soil health.

The acute toxicity test with *E. fetida* was only able to detect some toxicity when the organisms were exposed to soils in the 'Fe' treatment, with mortality in the 100% exposure. In contrast to the mortality bioassay, the avoidance tests were more sensitive, showing that some of the treatments had their habitat function impaired, with avoidance percentages higher or equal to 60%. The 'Fe+RP' treatment triggered a detrimental effect on the earthworms, which avoided the soil in all the dilutions tested. A limited habitat function was also found in the 'Ca', 'Fe+Ca' and in the unamended treatments. The 'RP' treatment improved the habitat function more than the other treatments.

'Fe' was the most toxic treatment to *D. magna* and *V. fischeri*. The rest of treatments did not affect *D. magna* immobilisation but unamended soils, along with 'Fe' and 'Fe+RP' treatments were found to be toxic to *V. fischeri*. However, bioluminescence in the 'Fe+RP' treatment showed an increment of the EC₂₀ value after the second fraction of 15 minutes, which meant a recovery of the bacteria and a potential reversible effect of the toxicity after prolonged time of exposure. All the other amendments had a beneficial effect on *V. fischeri*, compared to the unamended soils.

No single bioassay is sufficient to monitor a remediation process, since organism response towards toxicity is complex. It is essential to carry out a series of bioassays and select the most reliable ones to assess the remediation process and the toxicity of the contamination.

***E. fetida* avoidance behaviour and *V. fischeri* bioluminescence tests were the most sensitive indicators of soil toxicity, supporting the case for future use in assessing the effects of amendment application on the remediation process at the Mónica mine site. Dehydrogenase activity measurement is recommended together with those two bioassays as in conjunction they provide reliable information on which ameliorants promote an improvement in soil quality when added to the contaminated soils.**

ÍNDICE

I	INTRODUCCION Y OBJETIVOS	
---	--------------------------	--

I.1	ARSÉNICO Y METALES PESADOS. PROPIEDADES QUIMICAS, FUENTES, TOXICIDAD, ABSORCIÓN POR LA PLANTA	3
1.	Arsénico	3
1.1	Propiedades químicas del arsénico	3
1.2	Arsénico en el medio ambiente. Fuentes naturales y antropogénicas	3
1.3	Relación de los constituyentes del suelo con el arsénico	5
1.3.1	Efecto del pH	5
1.3.2	Efecto del Eh	7
1.3.3	Efecto de los óxidos y oxihidróxidos	8
1.3.4	Efecto de los minerales de la arcilla	10
1.3.5	Competencia con el fosfato y otros elementos del suelo	10
1.3.6	Efecto de la materia orgánica	10
1.4	Absorción, transporte y acumulación en la planta	11
1.4.1	Absorción	12
1.4.2	Transporte y acumulación	12
2.	Cobre	14
2.1	Propiedades químicas del cobre	14
2.2	Cobre en suelo	14
2.3	Cobre en planta	14
3.	Manganeso	15
3.1	Propiedades químicas del manganeso	15
3.2	Manganeso en suelo	15
3.3	Manganeso en planta	16
4.	Zinc	17
4.1	Propiedades químicas del Zn	17
4.2	Zinc en suelo	17
4.3	Zinc en planta	18
5.	Cadmio	19
5.1	Propiedades químicas del cadmio	19
5.2	Cadmio en suelo	19
5.3	Cadmio en planta	19

I.2	BIO/DISPONIBILIDAD DE ELEMENTOS TRAZA. TÉCNICAS PARA LA PREDICCIÓN DE SU DISPONIBILIDAD	21
I.3	LA PROBLEMÁTICA DE LAS ZONAS MINERAS. LEGISLACIÓN DE LA GESTIÓN DE RESIDUOS MINEROS	29
I.4	FITORREMEDIACIÓN. ATENUACIÓN NATURAL	38
I.5	ENMIENDAS PARA LA REMEDIACION DE SUELOS CON MULTICONTAMINACIÓN	47
I.6	EVALUACIÓN DEL PROCESO REMEDIADOR. ECOTOXICOLOGÍA	55
I.7	TRABAJOS PREVIOS EN LA MINA MÓNICA DE BUSTARVIEJO (COMUNIDAD DE MADRID)	64
	OBJETIVOS-OBJECTIVES	69
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	73
1.	Mineralización ácida de muestras de suelos y planta	75
2.	Extracción del elemento disponible en suelo	75
3.	Análisis de elementos traza	76
4.	pH y conductividad eléctrica del suelo	77
5.	Capacidad de campo del suelo	77
6.	Germinación	77
7.	Tipos de cultivo	78
8.	Análisis estadísticos de los datos	79
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81

III.	ESTUDIO DE LAS ESPECIES VEGETALES PARA SU USO EN FITORREMEDIACIÓN	81
-------------	--	-----------

III.1	ENSAYOS DOSIS RESPUESTA CON <i>Salix atrocinerea</i>, <i>Cytisus scoparis</i> E <i>Hibiscus cannabinus</i>	83
--------------	---	-----------

1.	Introducción y objetivos	83
2.	Materiales y Métodos	84
2.1	Material vegetal	84
2.2	Muestreo y determinaciones analíticas	87
2.3	Cinéticas de absorción de arsénico	87
2.4	Análisis de los indicadores de estrés	88
3.	Resultados y discusión	90
3.1	Biomasa y síntomas visuales	90
3.2	Concentración y acumulación de arsénico	91
3.3	Concentración de fósforo	93
3.4	Cinéticas de absorción de arsénico	95
3.5	Indicadores de estrés	98
3.5.1	Clorofilas y MDA	98
3.5.2	Glutation y fitoquelatinas	100
4.	Conclusiones-Conclusions	104

III.2	ENSAYOS EN INVERNADERO EN MESOCOSMOS: ESPECIES ARBUSTIVAS EN SUELOS MULTI-CONTAMINADOS Y EN SUELOS CON ARSÉNICO AÑADIDO	107
--------------	--	------------

1.	Objetivos	107
-----------	------------------	------------

Ensayo 1.	SUELOS CON ARSÉNICO AÑADIDO	108
------------------	------------------------------------	------------

2.	Materiales y Métodos	110
3.	Resultados	113
3.1	Suelo y disolución del suelo	113
3.1.1	Valores de pH	113
3.1.2	Concentración de As en la disolución del suelo	115
3.1.3	Concentración de As en la extracción secuencial del suelo	117
3.2	Planta	120
3.2.1	Biomasa vegetal	120
3.2.2	Concentración y acumulación de As en planta	122

ENSAYO 2. SUELOS MINEROS CONTAMINADOS CON ARSÉNICO Y METALES PESADOS	125
4. Materiales y Métodos	125
4.1 Suelo y planta	125
5. Resultados	127
5.1 Suelo	127
5.2 Planta	132
5.2.1 Biomasa	132
5.2.2 Concentración de As y metales. Acumulación de As	133
6. Discusión general	136
6.1 Concentración de elementos traza en el suelo y en la disolución del suelo. Relación con el pH	136
6.2 Biomasa	139
6.3 Concentración de As y metales en planta	140
6.4 Efecto de las plantas sobre concentración de elementos en suelo y pH	143
7. Conclusiones-Conclusions	145
 IV. APLICACIÓN DE ENMIENDAS EN SUELOS CONTAMINADOS	 149
 IV.1 LIXIVIACIÓN DE ARSÉNICO Y METALES PESADOS EN ENSAYOS CON COLUMNAS	 151
1. Introducción y objetivos	151
2. Materiales y Métodos	153
2.1 Descripción de las columnas Pharmacia Biotech XK 50/30	153
2.2 Procedimiento	154
2.3 Determinaciones analíticas	155
2.4 Representación gráfica de los resultados	156
3. Resultados y Discusión	157
3.1 Caracterización del material contaminado	157
3.2 pH y conductividad eléctrica	158
3.3 Carbono orgánico disuelto	163
3.4 Arsénico y metales en los lixiviados	163
3.4.1 Arsénico	163
3.4.2 Metales	171
3.5 Ecuaciones de las curvas de lixiviación	179

4.	Conclusiones y recomendaciones	187
-----------	---------------------------------------	------------

IV.2	APLICACIÓN DE ENMIENDAS A SUELOS CONTAMINADOS EN ENSAYOS EN MESOCOSMOS	191
1.	Introducción y objetivos	191
2.	Materiales y Métodos	192
2.1	Preparación de suelo y planta	192
2.2	Seguimiento y muestreo del ensayo	193
2.3	Determinaciones analíticas	193
3.	Resultados	195
3.1	Parámetros iniciales del suelo	195
3.2	Análisis de la disolución del suelo	197
3.3	Biomasa y concentración de metal(oide)s en planta	201
4.	Discusión	204
4.1	Suelo	204
4.2	Planta	206
5.	Conclusiones-Conclusions	208

IV.3	APLICACIÓN DE ENMIENDAS A SUELOS CONTAMINADOS EN ENSAYOS EN MACROCOSMOS	211
1.	Introducción	211
2.	Materiales y Métodos	211
3.	Resultados y Discusión	214
3.1	Suelo	214
3.2	Disolución del suelo	217
3.3	Biomasa y concentración de elementos en planta. Relación con la concentración de elementos en el suelo y en la disolución del suelo	226
4.	Conclusiones-Conclusions	235

V.	ECOTOXICOLOGÍA	239
	EVALUACIÓN DE LA REMEDIACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS. ECOTOXICOLOGÍA	241

1.	Introducción y objetivos	241
2.	Materiales y Métodos	242
2.1	Ensayos enzimáticos	242
2.2	Ensayos de toxicidad aguda directos	243
2.2.1	Ensayos de mortalidad de <i>Eisenia fetida</i>	243
2.2.2	Ensayos de evitación de <i>Eisenia fetida</i>	244
2.3	Bioensayos de exposición indirecta	246
2.3.1	Ensayos de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	246
2.3.2	Inhibición de la luminiscencia de <i>Vibrio fischeri</i>	246
2.4	Análisis estadísticos	247
3.	Resultados y discusión	248
3.1	Efecto de las enmiendas sobre las actividades enzimáticas	248
3.2	Efecto de las enmiendas sobre la mortalidad y evitación de <i>Eisenia fetida</i>	254
3.3	Efecto de las enmiendas sobre la inmovilización de <i>D. magna</i> y la inhibición de la bioluminiscencia de <i>V. fischeri</i>	255
4.	Conclusiones-Conclusions	259
CONSIDERACIONES FINALES		263
CONCLUSIONES		273
REFERENCIAS		279

INTRODUCCIÓN. CAPÍTULO I

CAPÍTULO I.1

ARSÉNICO Y METALES PESADOS. PROPIEDADES QUÍMICAS, FUENTES, TOXICIDAD, ABSORCIÓN POR LA PLANTA

En este capítulo se hace referencia brevemente a las propiedades químicas más comunes de los elementos traza que se tratan en esta Tesis, señalando los principales procesos que gobiernan la química de estos elementos en el suelo, y que condicionarán la disponibilidad de los mismos. Se presta una especial atención al arsénico, al igual que en el resto de la memoria.

1. ARSÉNICO

1.1 Propiedades químicas del arsénico

El arsénico es un elemento perteneciente al grupo 15 de la tabla periódica, de número atómico 33 y peso atómico 74,92. Es un metaloide que puede aparecer bajo distintas formas y estados de oxidación, siendo los más comunes -3, 0, +3, +5. Las arsinas y las metilarsinas se corresponden con el estado de oxidación -3 y son inestables en el aire. El arsénico elemental se forma por la reducción de los óxidos de arsénico. Los compuestos más estables son los que se forman en los estados de oxidación +3 y +5.

La Figura 1 representa el diagrama Eh-pH para compuestos inorgánicos del arsénico. En un medio aeróbico el estado de oxidación dominante es el +5 y para valores de pH hasta 2 el arsénico aparece como H_3AsO_4 . Entre 2 y 11 este compuesto aparece disociado en H_2AsO_4^- y HAsO_4^{2-} .

1.2 Arsénico en el medio ambiente. Fuentes naturales y antropogénicas

El arsénico está ampliamente distribuido en la naturaleza, estando presente prácticamente en todos los compartimentos ambientales. En la corteza terrestre generalmente aparece en concentraciones entre 1,5 y 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y ocupa el puesto número 52 en abundancia.

Forma parte de no menos de 245 minerales y se encuentra en altas concentraciones en depósitos de azufre, por ejemplo como As_2S_3 , AsS , FeAsS , FeAs_2 , y de otros elementos formando compuestos como NiAs , CoAsS , $\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$ y $\text{Cu}_3\text{AsS}_{13}$. Es destacable la pirita, que puede contener hasta 0,5% de arsénico (National Academy of Sciences). Es uno de los principales elementos contaminantes de suelo y agua de las zonas mineras, siendo las formas inorgánicas As(V) y As(III) más tóxicas que muchas formas organoarsenicales (Lin y Puls, 2000).

En el aire de las zonas urbanas la concentración es aproximadamente de $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ de aire. En el agua marina la concentración de As varía entre $0,09 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Bissen y Frimmel, 2003), mientras que en aguas continentales la concentración suele estar por debajo de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Smedley y Kinniburgh, 2002).

Una de las principales fuentes de arsénico es la minería, sobre todo de cobre, níquel, plomo y zinc. Se estima que al año se emiten 62.000 toneladas de arsénico como subproducto de estas actividades. Otra de las fuentes que libera grandes cantidades de arsénico a la atmósfera es la quema de combustibles fósiles, para su uso doméstico o bien en centrales de producción de energía, generando emisiones de arsénico volátil en la forma As_4O_6 (Biessen y Frimmel, 2003). El uso de fungicidas, herbicidas e insecticidas de arsénico en la agricultura y en la industria de la madera también aporta arsénico al medio. Hasta la introducción del DDT en 1947, se utilizaban grandes cantidades de compuestos inorgánicos de arsénico como arseniato de plomo, arseniato de sodio, arseniato de calcio y arsenito de zinc para el cultivo de frutales y viñedos. El monometil arseniato mosódico, metil arseniato disódico y ácido dimetilarsínico se usaban como herbicidas en la producción de algodón. Por último, antes del descubrimiento de los antibióticos, los compuestos de arsénico se empleaban contra enfermedades como la soriasis y la leucemia (1% de arsenito de potasio) como tratamiento de fortalecimiento. Se solía recomendar yoduro de arsénico y tricloruro de arsénico para el reumatismo, artritis, enfermedades crónicas de la piel, malaria, tuberculosis, diabetes y anemia.

El arsénico procedente de fuentes naturales es igualmente una fuente importante de este elemento. Depende de la composición litológica de los emplazamientos y de la naturaleza de los minerales que lo constituyen. Las rocas sedimentarias, por ejemplo, contienen más arsénico que las rocas ígneas (Tabla 1, Adriano, 2001). En determinadas zonas como la India y Bangladesh, la fuente de arsénico es principalmente geológica. El arsénico procede de la oxidación de depósitos de pirita rica en arsénico tras la retirada de grandes cantidades de aguas subterráneas para su uso en irrigación de cultivos. La entrada de aire en los acuíferos favorece la oxidación de los sulfuros y la movilización del arsénico (Das et al., 1996).

Tabla 1. Concentraciones medias de arsénico en algunos materiales ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Material	Concentraciones medias	Intervalo
Rocas ígneas	1,5-3	0,06-113
Rocas sedimentarias	0,3-500	-
Roca caliza	1,7	0,1-20
Petróleo	0,2	<0,003-1,11
Lodos residuales	14,3	3-30
Carbón	13	Traza-2000
Cenizas de la combustión del carbón	189	90-1200

1.3 Relación de los constituyentes del suelo con el arsénico

La dinámica y movilidad del arsénico está principalmente controlada por seis factores o procesos que ocurren en el suelo y en el agua, pudiendo interactuar entre sí (Cheng et al., 2009):

- pH
- Condiciones redox
- Adsorción y desorción
- Adsorción por competencia con otros iones
- Precipitación sobre fase sólida y disolución
- Actividad biológica

Dependiendo de estas condiciones, el arsénico y otros elementos traza se pueden encontrar bajo diferentes formas, las cuales condicionan su comportamiento en el suelo. En la Tabla 2 queda resumido el fraccionamiento de los elementos traza en el suelo.

Tabla 2. Formas de retención en el suelo de elementos traza y disponibilidad relativa (Cala, 1995).

Forma de retención en el suelo	Disponibilidad relativa
Iones en solución del suelo	Fácilmente disponibles
Iones en complejo de cambio	Relativamente disponibles
Elementos quelados por moléculas orgánicas	Menos disponibles
Elemento precipitado o coprecipitado	Disponible sólo si ocurre alguna alteración
Elemento en la estructura mineral	Disponible sólo después de la meteorización
Incorporado a la matriz biológica	Disponible después de la descomposición

1.3.1 Efecto del pH

La carga total del suelo es igual a la suma de la carga permanente de los minerales de la arcilla procedente de las sustituciones isomórficas (negativa) y de la carga dependiente del pH. La carga pH-dependiente aparece en los minerales de la arcilla, en los oxihidróxidos de metales de Fe, Al y Mn y en la materia orgánica. En medio ácido, los grupos funcionales de los bordes de estos materiales se protonan, se crea un campo eléctrico positivo que atrae de la disolución iones cargados negativamente. Si el medio es básico, ocurre una desprotonación. En este caso los grupos funcionales quedan cargados negativamente y atraen cationes de la disolución del suelo. Según aumenta el pH del suelo, la desprotonación es más efectiva. Por ejemplo, en las superficies de la materia orgánica, ocurre a pH proximadamentees 4. Este valor de pH se corresponde con el punto cero de carga (PZC), el cual es un valor característico del pH por debajo del cual el componente del suelo está cargado positivamente (protonación) y por encima negativamente (desprotonación). Los oxihidróxidos también presentan un PZC, en este caso superior al de la materia orgánica (Tabla 3).

Tabla 3. PZC en oxihidróxidos de Fe (Cala, 1995).

Oxihidróxido	Superficie específica (m ² /g)	PZC
Goetita	80-90	7-7,5
Ferrihidrita	180-100	7,5
Birnesita	30-300	1,5-2,5
Hematita	80-90	8,5

Estudios que se basan en la adsorción de As en el suelo y en fases minerales puras demuestran que generalmente la solubilidad del As(V) aumenta con el pH dentro del rango normal de pH en suelos, comúnmente entre 3-8 (Fitz y Wenzel, 2002), debido a que la carga neta de las superficies del suelo es más negativa debida a la disociación de los distintos grupos funcionales. La forma química H_2AsO_4^- domina sobre la forma HAsO_4^{2-} por debajo de valores de pH 6,97 (Sadiq et al., 1997). En cuanto al As (III), el pK_1 del ácido arsenioso es 9,22, lo que indica que por debajo de este pH el ácido arsenioso no tiene carga, favoreciendo una mayor solubilidad en la mayoría de los suelos agrícolas. Efectivamente, la pobre adsorción de As(III) en el suelo es debida a su carácter neutro (Lakshmipathiraj et al., 2006).

1.3.2 Efectos del Eh

La Figura 1 muestra la especiación de As en función del pH y del Eh. En condiciones oxidantes ($\text{pe} + \text{pH} > 10$) la forma predominante de As es arseniato (Masscheleyn et al., 1991). Si el potencial redox comienza a ser suficientemente reductor, la especie predominante es arsenito ($\text{pe} + \text{pH} < 8$). Por debajo de valores de Eh iguales a -250 mV, pueden formarse compuestos de arsénico, tales como As_2S_3 en presencia de S o sulfuro de hidrógeno. Estos compuestos no son estables bajo condiciones ácidas. La arsina (As_3H) y el arsénico elemental se forman bajo condiciones altamente reductoras (Bissen y Frimmel, 2003).

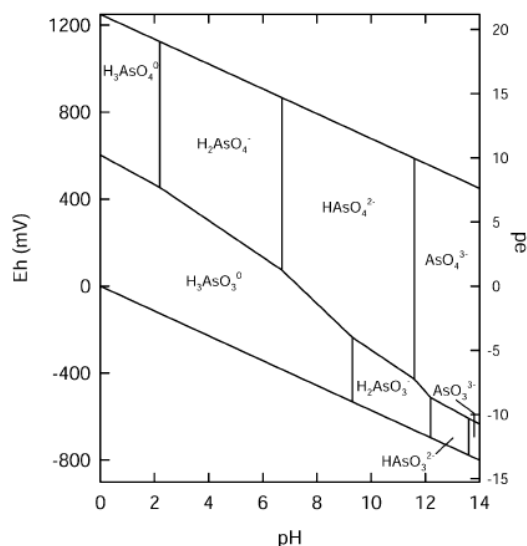


Figura 1. Formas y especiación química del arsénico en función del pH, Eh y pe (Smedley y Kinniburgh, 2002).

En conclusión, en condiciones oxidantes donde el arseniato es la especie predominante y dentro de un rango de pH propio de suelos agrícolas, la solubilidad del arseniato aumenta a medida que el pH sube. En condiciones reductoras, la especie predominante arsenito se encuentra sin carga por debajo de su pK_1 , 9,22, dificultando su adsorción por las superficies del suelo y favoreciendo a su mayor solubilidad. La mayoría de los suelos presentan condiciones oxidantes, por lo que un aumento del pH rizosférico podría favorecer la movilización del As de las fracciones más fácilmente disponibles e intercambiables alrededor de las raíces de las plantas.

1.3.3 Efecto de los óxidos y oxihidróxidos

La adsorción de As(V) y As(III) depende del contenido de óxidos del suelo. Se ha observado que aumentando el pH en suelo con un bajo contenido de óxidos, el efecto sobre la adsorción de As era insignificante, mientras que en suelos con un contenido considerable de óxidos, la adsorción de As(V) disminuía a medida que aumentada el pH (Smith et al., 1999).

El As(V) tiene una gran afinidad por las superficies de los óxidos y oxihidróxidos de Fe, Al y Mn, formando complejos de esfera interna y externa, que son los principales mecanismos de adsorción de arseniato y arsenito sobre las superficies minerales (Cheng et al., 2009). La Figura 2 muestra algunos de los mecanismos de retención de As sobre la superficie de los oxihidróxidos. La adsorción no específica, conocida como complejación de esfera externa, implica la atracción electrostática entre una superficie cargada y un ion en solución de carga opuesta, de manera que el ión adsorbido permanece a una cierta distancia del mineral adsorbido. La adsorción específica, o complejación de esfera interna, consiste en la formación de un complejo coordinado con la superficie del mineral, son complejos más difíciles de romper y más estables. Se ha demostrado que la adsorción de arseniato sobre la superficie de la goetita es el resultado de un proceso en el que se forman complejos bidentados de esfera interna (Grossl et al., 1997).

En general, son los oxihidróxidos de Fe los minerales que mas comúnmente están relacionados con la adsorción de As tanto en condiciones ácidas como alcalinas, mientras que los oxihidróxidos de Al y Mn juegan un papel mas relevante en condiciones ácidas (Cheng et al., 2009).

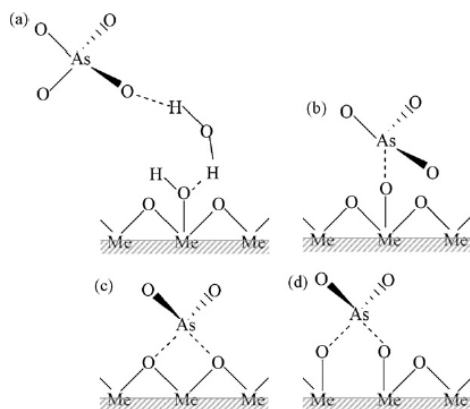
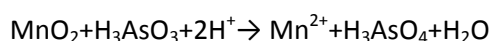


Figura 2. Configuración de moléculas de arseniato adsorbidas sobre las superficies de oxihidróxidos: (a) complejos de esfera externa; (b, c y d) diferentes complejos de esfera interna (Cheng et al., 2009)

En cuanto al potencial redox, bajo condiciones reductoras la estructura de los hidróxidos de Fe y de los óxidos de Mn se rompe, y el arsénico fijado sobre estas superficies se libera al medio. En condiciones altamente reductoras puede coprecipitar con sulfuros de hierro como arsenopirita o formando sulfuros de arsénico (AsS , As_2S_3). El As(III) también puede ser adsorbido y oxidado en la superficie de algunos oxihidróxidos de hierro como por ejemplo sobre goetita y ferrihidrita; y de manganeso como la birnesita (Lin y Puls, 2000). También se ha demostrado que la adsorción de As(III) sobre la superficie de los oxihidróxidos disminuía con el aumento del pH (Dixit y Hering, 2003).

Comparando diferentes oxihidróxidos, *Bowell* (1994) determinó que la adsorción del arsénico era mayor sobre la goetita que sobre la magnetita y a su vez mayor para el As(V) que para el As (III). Entre goetita, magnetita y hematita, *Giménez et al.* (2007) encontraron que la máxima capacidad de adsorción se produjo sobre la hematita, sobre todo a pH ácidos, y que la disminución de la adsorción en los tres sólidos ocurría a valores alcalinos de pH.

Además de la adsorción sobre las superficies de óxidos u oxihidróxidos, estas partículas tienen un papel importante sobre la especiación del As. Una de las reacciones más estudiadas es la oxidación de arsenito sobre las superficies de óxidos de Mn, utilizando como modelo la birnesita. La reacción neta por la que el arsenito se oxida por óxidos de Mn resultando en la precipitación de compuestos de Mn-arseniato es la siguiente (*Tournassat et al.*, 2002):



La corrosión de Fe metálico también causa la oxidación de arsenito a arseniato en condiciones aerobias dando lugar a coprecipitados de As(V) sobre los productos minerales formados (*Manning et al.*, 2002).

1.3.4 Efecto de los minerales de la arcilla

Los minerales de la arcilla presentan una carga superficial negativa permanente como consecuencia de las sustituciones isomórficas. Los estudios muestran que las propiedades de los minerales de la arcilla controlan la adsorción de As. Por ejemplo, la illita y la montmorillonita, que son minerales 2:1 (una capa octaédrica entre dos tetraédricas, ratio Si/Al de 2) están cargados negativamente debido a las sustituciones isomórficas de los cationes Si^{+4} y Al^{+3} por otros cationes de menor carga (Mg^{2+} por Al^{3+} en la capa octaédrica y Mg^{2+} o Al^{3+} por Si^{+4} en la capa tetraédrica), lo que indica que la adsorción de aniones se realizaría mediante cationes puente. Se puede crear carga positiva por la protonación en los bordes de ruptura de los enlaces Al-OH, dando lugar a la adsorción de aniones. Los minerales de la caolinita (por ejemplo caolinita y halosita) son minerales 1:1 (capa octaédrica y otra tetraédrica alternando, ratio Si/Al de 1), no tienen sustituciones isomórficas debido a que la red cristalina permite una mínima expansión dificultando la entrada de cationes o agua, de ahí que la capacidad de cambio de cationes se debe fundamentalmente a los grupos hidroxilo de los bordes de ruptura, que dependiendo del pH se pueden protonar o desprotonar. Por todas estas razones, dada la mayor carga superficial de la montmorillonita, esta puede adsorber más As(V) y As(III) que la caolinita (Frost y Griffin, 1977). La desorción de arsénico puede retardarse con el tiempo debido a que al arsénico inicialmente adsorbido en la superficie de la arcilla puede integrarse con el tiempo en la estructura del mineral (Lin y Puls, 2000).

1.3.5 Competencia con el fosfato y otros elementos del suelo

Debido a la similitud química entre el arseniato y el fosfato, estos iones compiten no solamente por los sitios de unión inespecíficos, sino también por los específicos, mediante reacciones de complejación, como por ejemplo en las superficies de los oxihidróxidos de hierro y aluminio, siendo los iones fosfato los que se adsorben preferencialmente (Jain y Loeppert, 2000). La aplicación de grandes cantidades de fósforo a un suelo contaminado por arsénico puede desplazar cantidades sustanciales de arsénico total (Adriano, 2001; Cao et al., 2003; Cao y Ma 2004). Se ha comprobado que el aumento de la disponibilidad de As con la incorporación de fosfato al suelo conlleva un incremento de la acumulación de arsénico en planta (Tao et al, 2006, Woolson et al, 1973).

Existen otros iones competidores menos eficaces que el fosfato en el desplazamiento del arsénico por las posiciones de cambio, por ejemplo sulfatos y carbonatos (Wang y Mulligan, 2006a). Por otro lado, cationes como Ca^{2+} y Fe^{2+} pueden aumentar la adsorción de arsénico,

aumentando las cargas positivas de las superficies de los óxidos mediante la formación de complejos con el calcio (Dutré y Vandecasteele, 1995).

1.3.6 Efecto de la materia orgánica

La composición de la materia orgánica, el grado de polimerización y su peso molecular son bastante heterogéneos. La solubilidad de los elementos traza dependen en gran parte del grado de humificación de la materia orgánica, es decir de la presencia de compuestos de alto o bajo peso molecular con menor o mayor solubilidad (Kumpiene et al., 2008).

En la bibliografía se pueden encontrar numerosos ejemplos que ponen de manifiesto que la relación entre As y materia orgánica es diversa, aumentando o disminuyendo la movilidad del arsénico (Cao et al., 2003; Gadepalle et al., 2007; Clemente et al., 2008, Beesley y Dickinson, 2010). La presencia de carbono orgánico disuelto es una de los factores determinantes del aumento de la solubilidad de As (Clemente et al., 2008).

La adsorción de As sobre la materia orgánica también es dependiente del pH. Los grupos funcionales de la materia orgánica, tales como carboxilos, alcoholes o carbonilos, pueden reaccionar protonándose o desprotonándose en función del pH modificando su capacidad de retención de As (Kalbitz y Wennrich, 1998).

1.4 Absorción, transporte y acumulación en la planta

No existe ninguna evidencia que demuestre que el arsénico sea esencial para la nutrición de las plantas, aunque se han observado casos en los que pequeñas cantidades de arsénico pueden estimular el crecimiento de las plantas (Gulz et al., 2005). Este efecto se ha atribuido al desplazamiento de los iones fosfato del suelo por iones arseniato con el resultado del aumento de fosfato disponible para la planta (Adriano, 2001). Existen especies de plantas que muestran una gran habilidad para tomar arsénico del suelo y muchas de ellas toleran una alta concentración de este elemento en sus tejidos. Son las llamadas plantas hiperacumuladoras de As, entre ellas destaca la primera planta hiperacumuladora de As descubierta, *Pteris vittata*.

1.4.1 Absorción

El arseniato es análogo al fosfato y se absorben por el mismo sistema de transportadores (Meharg y Macnair, 1994). El arseniato sustituye al fosfato en la síntesis de ATP y en varias reacciones de fosforilación, interfiriendo de esta forma en el metabolismo del fosfato. La sensibilidad al arseniato es dependiente de la nutrición de fósforo, de forma que un incremento de los niveles de fosfato en planta puede dar lugar a una reducción de la absorción de arseniato mediante la supresión del sistema de alta afinidad fosfato/arseniatos (Esteban et al., 2003).

Se ha descubierto en plantas de arroz, que el transporte de arsenito se produce a través de una familia de acuoporinas que son permeables al arsenito pero no al arseniato (Ma et al., 2008). Las acuoporinas transportan moléculas neutras, como agua, glicerol y urea. Según su localización y homología se clasifican en cuatro subfamilias, siendo una de ellas las proteínas intrínsecas de membrana (NIP). El arsenito, con un pKa igual a 9,22, se presenta como molécula sin carga de ácido arsenioso a pH inferior a 8. El descubrimiento de un transportador NIP en raíz para el ácido silícico, que tampoco posee carga a pH 8 y cuyo tamaño molecular es similar al del ácido arsenioso, conduce a la hipótesis de que el arsenito se transporte mediado por transportadores del ácido silícico (Ma et al., 2008).

1.4.2 Transporte y acumulación

Cuando el arseniato es absorbido por la raíz, es rápidamente reducido a arsenito. En el proceso se consume glutatión y está mediado por arseniato reductasas (Xu et al., 2007), aunque también puede ser un proceso no mediado enzimáticamente (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). La mayoría de las plantas parecen tener altos niveles de actividad arseniato reductasa, lo que explica la predominancia de especies de arsenito en las raíces. Una vez dentro de la raíz, su transporte hasta otros órganos generalmente no es muy efectivo, por lo que suele permanecer en las raíces, excepto en las plantas acumuladoras e hiperacumuladoras, cuya capacidad de traslocación de As a la parte aérea es excepcional.

Por consiguiente, una vez reducido el arseniato a arsenito caben varias posibilidades:

■ El As reducido permanece en la raíz: el arsénico reducido se compleja con grupos tioles del glutatión y de las fitoquelatinas. Se cree que la mayoría del As(III), complejo o no, es secuestrado por la vacuola de la raíz, mediado por transportadores ABC (Zhao et al., 2009).

■ El As reducido entra en el xilema. La mayoría de las plantas actúan como exclusoras, por lo que solo movilizan una pequeña proporción del As presente en la raíz. Por ejemplo, en plantas de tomate se ha encontrado que del arsénico presente en la savia del xilema, la mayor parte es

arsenito (Xu et al., 2007). Recientemente se ha descubierto un transportador localizado entre la exodermis y la endodermis, que permite la entrada de arsenito en el xilema. Este transportador, Lsi2, es un transportador de Si (Ma et al., 2008). No existen evidencias por las que el arsenito aparezca complejo con grupos tioles en el xilema. De hecho, la complejación con tioles disminuye la movilidad del arsenito de la raíz a la parte aérea (Liu et al., 2010). La descarga en la hoja se asume que se hace a través del mismo sistema de transportadores que actúan en la raíz, así como la entrada de arsenito en la vacuola, pero se sabe poco sobre la identidad de estos transportadores (Zhao et al., 2010).

Se desconoce bastante sobre el transporte de As en el floema, tanto en la forma como es transportado, como en los mecanismos de carga y descarga. El transporte vía floema ha sido poco estudiado ante las dificultades técnicas que suponen la extracción de muestras de floema. Estudios recientes muestran que los principales ligandos encontrados en la savia floemática son nicotinamida, GSH y PCs (Mendoza-Cózatl et al., 2008,2011). Según argumentan algunos autores, la presencia de PCs en el floema no era esperable, puesto que las PCs han sido consideradas moléculas que mediaban el transporte de metales del citosol a las vacuolas (Mendoza-Cózatl et al., 2011). Sin embargo, análisis realizados en ICP-MS revelan en la savia floemática de diferentes especies la presencia de PCs (*Brassica napus* en Mendoza-Cózatl et al., 2008; *Ricinus communis* en Ye et al., 2010).

2. COBRE

2.1 Propiedades químicas del cobre

El cobre es un elemento que pertenece al grupo 11 de la tabla periódica, de número atómico 29 y peso atómico 63,55. En la naturaleza, el Cu está presente mayoritariamente en dos estados de oxidación, I y II, pero la forma monovalente es inestable en suelo, por lo que, incluso en condiciones reductoras, el Cu no tiende a ser reducido significativamente (Whitehead, 2000). El cobre tiene una gran afinidad por los sulfuros, por lo que los principales minerales que contienen Cu son la calcopirita CuFeS_2 ; bornita, Cu_5FeS_4 , calcocita Cu_2S ; y covelita CuS . Durante la meteorización de los sulfuros, el Cu se incorpora a óxidos y carbonatos entre los cuales destacan por su abundancia la cuprita, Cu_2O ; la malaquita $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$; y la azurita $\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$. También se encuentra generalmente asociado con la esfalerita, ZnS ; pirita FeS ; y galena PbS .

2.2 Cobre en suelo

El principal parámetro que contribuye de manera significativa a la disponibilidad de Cu en el suelo es el contenido de la fracción arcilla. Otros factores como los óxidos de Fe y Mn también influyen sobre el contenido de Cu en el suelo. Se asocia fuertemente con la materia orgánica, siendo esta relación más significativa que la que pueden tener otros metales como Zn y Mn (McGrath et al., 1988). De ahí que el Cu se encuentre frecuentemente ligado a la fracción orgánica del suelo. En suelos minerales, el cobre puede aparecer asociado a complejos arcillo-húmicos. Se encuentra principalmente en horizontes superiores del suelo, pero debido a su tendencia a ser retenido por la materia orgánica, carbonatos, minerales de la arcilla y oxihidróxidos de Fe y Mn, también puede acumularse en capas más profundas del suelo, aunque la distribución del Cu en el perfil del suelo es bastante uniforme (Kabata-Pendias, 2010).

2.3 Cobre en planta

El cobre es un elemento esencial para las plantas. Se requiere en pequeñas concentraciones pero su deficiencia afecta a multitud de procesos fisiológicos: fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno, nodulación, síntesis de proteínas, síntesis de lignina de la pared celular, formación de semillas y frutos, etc. El exceso de cobre en planta puede inducir pérdida de vigor, desarrollo deficiente, reducción de la ramificación y del engrosamiento, caída de hojas y coloración oscura de las raíces. Un exceso de Cu puede limitar la absorción de Fe y por tanto inducir clorosis. Esto sugiere que los síntomas cloróticos en hojas jóvenes que sufren toxicidad por Cu estén inducidos por la deficiencia de Fe (Reichman, 2002).

3. MANGANESO

3.1 Propiedades químicas del manganeso

El manganeso es un elemento que pertenece al grupo 7 de la tabla periódica, de número atómico 25 y de peso atómico 54,94. Se sitúa al lado del Fe en el cuarto periodo por lo que comparten propiedades químicas. Ambos suelen encontrarse asociados en la naturaleza, por lo que habitualmente se encuentran coexistiendo en formas minerales. El manganeso ocupa la posición 12 de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. Los minerales más comunes de Mn son óxidos, carbonatos y silicatos.

3.2 Mn en suelo

Las reacciones más comunes que controlan el comportamiento del Mn en el suelo son las de oxidación-reducción e hidrólisis. El estado redox tiene una gran influencia sobre la especiación y solubilidad del Mn en la solución del suelo (Lindsay, 1979). En el suelo, los estados de oxidación más comunes son II, III y IV, siendo el más estable la forma reducida Mn(II) (Whitehead, 2000). La reducción puede ocurrir mediada por procesos abióticos o bióticos (por Fe^{2+} , Cr^{3+} , S, fenoles, sustancias húmicas y bacterias reductoras), y la oxidación puede ocurrir bajo condiciones aerobias o anaeróbicas y es mediada biológicamente o mediante autocatálisis. La solubilidad de los compuestos de Mn es baja en condiciones oxidantes y a valores de pH cercanos a la neutralidad puesto que el equilibrio tiende a desplazarse a favor de Mn(III) y Mn(IV), los cuales existen fundamentalmente como hidróxidos y óxidos insolubles. La solubilidad del Mn(II) es mayor en suelos ácidos, pero está sujeto a otras variables como la complejación con la materia orgánica y el pH. A valores de pH superiores a 7, el Mn(II) tiende a precipitar como óxido u hidróxido, pudiendo formar coprecipitados con óxidos de Fe. Por otro lado, la capacidad que tienen las especies inorgánicas de Mn de formar complejos con ligandos orgánicos puede aumentar la solubilidad del Mn bajo condiciones básicas. El Mn(III) es una especie extremadamente reactiva y tiende a desaparecer rápidamente, aceptando o donando electrones. La relación del Mn con la materia orgánica en la formación de complejos es más débil que la que poseen Cu y Zn. Esto significa que el Mn es un débil competidor del Cu^{2+} y Zn^{2+} , así como de otros cationes cuya presencia en el suelo es mayoritaria, como Ca^{2+} y Mg^{2+} . Por tanto, la materia orgánica tiene menos peso sobre la disponibilidad de Mn para las plantas que en el caso del Zn y especialmente del Cu. Todas estas evidencias muestran la compleja mineralogía y comportamiento químico del Mn. Su participación en procesos de reducción-

oxidación resulta en la formación de un gran número de óxidos e hidróxidos de diversa estabilidad y propiedades (Kabata-Pendias, 2010).

El Mn no ha sido considerado un elemento contaminante en el suelo. Sin embargo, sí se ha establecido un límite de concentración máxima aceptable en suelos agrícolas entre 1500 y 3000 mg·kg⁻¹ (Kabata Pendias, 2010).

3.3 Mn en planta

El transporte de Mn en la interfase suelo-raíz se realiza en la forma reducida Mn²⁺, de manera similar a otros cationes divalentes como Ca²⁺ y Mg²⁺. Cuando el Mn se encuentra en forma móvil en el suelo, es absorbido fácilmente por las plantas, de ahí que exista una correlación positiva entre contenido de Mn en suelo y en planta, y negativa de este último con el pH.

Comparado con el Cu y Zn, una gran proporción de Mn en el xilema existe como forma no complejada, como ion libre (Reichman, 2002). En el floema, el Mn puede aparecer libre, pero también complejo con moléculas orgánicas (Van Goor y Wiersma, 1976).

La movilidad de Mn en el floema es variable y depende del estatus de Mn en la planta y de la fuente y de los órganos sumideros a los que se dirige. Por ejemplo, el Mn se ha encontrado en frutos, semillas y tejidos de almacenamiento en raíz en concentraciones inferiores a los del tejido en hoja, por lo que la baja concentración de Mn está condicionada por su escasa movilidad en el floema hasta estos compartimentos vegetales. Normalmente el Mn se distribuye hacia tejidos meristemáticos, encontrándolo principalmente en partes jóvenes. Todo indica que la movilidad del Mn en planta es baja cuando el aporte del mismo a la planta es limitado.

La concentración crítica de Mn en planta se encuentra en el intervalo 15-25 mg·kg⁻¹, pero depende obviamente de la especie, estadio de crecimiento y órgano vegetal. La concentración tóxica es más variable, pero normalmente a partir de 400 mg·kg⁻¹ las plantas ofrecen síntomas de toxicidad. Se han descrito plantas acumuladoras de Mn, la mayoría de ellas en suelos ultramáficos, superando 10.000 mg·kg⁻¹ de Mn, el criterio establecido para la hiperacumulación de Mn (Baker y Brooks, 1989). La mayoría de las plantas hiperacumuladoras de Mn se han descubierto en Nueva Caledonia y Australia (Fernando et al., 2008). Se reconoce globalmente la existencia de nueve especies diferentes consideradas hiperacumuladoras de Mn, por ejemplo el género *Gossia* en Australia (hasta 21500 mg·kg⁻¹), la subespecie *Phytolacca* (Xue et al., 2004) y la más reciente descubierta hasta ahora *Polygonum pubescens*, en suelos industriales en China (Deng et al., 2010).

4. ZINC

4.1 Propiedades químicas del zinc

El zinc es un elemento que pertenece al grupo 12 y se encuentra en el cuarto periodo de la tabla periódica, de número atómico 30 y peso atómico 65,4. Es un elemento divalente en todos sus compuestos. En soluciones acuosas ácidas y neutras, el Zn^{2+} se presenta hidratado, y en soluciones alcalinas precipita como hidróxido. Tiene una elevada electronegatividad, por lo que puede formar enlaces con otros elementos, especialmente con aniones de S. Los sulfuros de Zn son bastante insolubles en agua pero se hidrolizan muy fácilmente. El Zn en los suelos procede fundamentalmente de la meteorización química y física de los materiales primarios (Broadley et al., 2007).

4.2 Zinc en suelo

Al igual que el Mn, la disponibilidad de Zn depende del pH del suelo y disminuye al aumentar éste. El Zn^{2+} compite con H^+ y Al^{3+} por las posiciones de intercambio del suelo. Aunque el Zn es un elemento muy móvil, la materia orgánica puede retenerlo mediante la formación de complejos (Kiekens, 1995), aunque su estabilidad es relativamente baja, de manera que la materia orgánica no tiende a ser un parámetro tan importante como el pH. Su disponibilidad también depende de la presencia de P, Ca, Al y óxidos de Fe y Mn. Puede precipitar en el suelo con hidróxidos, carbonatos, fosfatos, sulfatos, molibdatos y otros aniones.

La inmovilización de Zn en el suelo se ha practicado mediante la incorporación de enmiendas de fósforo (Kumpiene et al., 2008), por precipitación como fosfatos. La incorporación o presencia de minerales de la arcilla ha sido un mecanismo eficiente de retención de Zn, donde las sustituciones de los bordes de ruptura de las capas octaédrica de los minerales de la arcilla, o la reacción con grupos silanol de las superficies de los minerales contribuye a la adsorción de este elemento (Alvarez-Ayuso et al., 2003).

Los niveles generales de Zn en distintos grupos de suelos se encuentran entre 60-89 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. La concentración total de Zn en suelos contaminados es muy superior. Por ejemplo, suelos próximos a las escombreras de una mina de arsenopirita contenían una media de 845 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Zn (Moreno-Jiménez et al., 2009); o en el accidente de Aznalcóllar hasta 1000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Zn en el margen del río Guadiamar (Clemente et al., 2003).

4.3 Zinc en planta

El zinc es un elemento esencial en la nutrición mineral de las plantas. Es un componente de multitud de proteínas, como deshidrogenasas, proteasas, peptidasas, fosfatasas, hidrolasas, pero es tóxico en exceso (Broadley et al., 2009).

La adquisición de Zn por las plantas de la solución del suelo se realiza principalmente como Zn^{2+} , pero también puede hacerlo complejoado con ligandos orgánicos. Las cinéticas de absorción del Zn muestran que pueden tener dos componentes, una representada por una curva de tipo Michaelis-Menten, con dos parámetros, velocidad máxima de absorción y constante de afinidad, y otra componente lineal, la cual sugiere que la absorción de Zn se rige por un mecanismo pasivo (Broadley et al., 2007). Algunos autores han atribuido esta componente lineal al Zn fuertemente retenido en las células de la pared celular, lo cual conduciría a una mala interpretación de los resultados. Estos ejemplos ponen de manifiesto que en la literatura existe cierta controversia en cuanto a determinar si la absorción de Zn es un proceso activo o pasivo (Kabata-Pendias, 2010).

La distribución de Zn en la planta generalmente sigue el siguiente patrón: raíz>hojas>tallo>corteza (Kabata-Pendias, 2010). Existen plantas hiperacumuladoras de Zn, y la más conocida, *Thlaspi caerulescens*, puede acumular mas de $30.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Zn (Broadley et al., 2007).

Se ha documentado una competencia entre la absorción de Cd y Zn por la planta (Smilde et al., 1992) debido a que Cd y Zn se absorben por el mismo sistema de transportadores de la membrana plasmática (Hart et al., 2002). Estos mismos autores también destacan que el Zn puede incluso inhibir el transporte de Cd hacia el xilema y en la carga y descarga del floema.

Es bien conocido el antagonismo Zn/Fe. Está documentado cómo un exceso de Zn puede limitar la absorción de Fe por la planta, y cómo el Fe disminuye la absorción y toxicidad de Zn. Los mecanismos de interacción son dos posibles: la competición entre el Fe y Zn en los procesos de absorción y en la interferencia en los procesos de complejación durante la absorción y transporte de Fe desde la raíz hasta la parte aérea.

5. CADMIO

5.1 Propiedades químicas del cadmio

El cadmio, con número atómico 48 y masa atómica 112,41, se encuentra en el quinto periodo y pertenece al grupo 12 de la tabla periódica al igual que el Zn, por lo que comparten ciertas propiedades químicas, como la elevada electronegatividad que determina que formen enlaces con otros elementos. El Cd tiene más afinidad por el S que el Zn, y su movilidad en suelos ácidos es superior a la del Zn (Alloway, 1995).

5.2 Cd en suelo

El contenido medio de Cd en la corteza terrestre es $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, y se presenta poco frecuentemente en forma pura. El único mineral que contiene cantidades significativas de cadmio es la greenockita (CdS), aunque también se encuentra presente en cantidades inferiores en la esfalerita (ZnS). Casi todo el cadmio producido comercialmente se obtiene como un subproducto del tratamiento de minerales de zinc, cobre y plomo. La fuente primaria de Cd es la ligada a los minerales primarios como en el caso del Zn.

Como los demás metales, la solubilidad del Cd en suelos depende del pH, siendo un factor determinante (Meers et al., 2007a). La reducción de su movilidad se produce a partir de procesos de adsorción y precipitación. A partir de 7,5, el Cd adsorbido en el suelo es menos movilizable, por lo que formas minerales de CdCO_3 y $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$ pueden ser las que controlen la solubilidad de Cd en suelos alcalinos (Kabata-Pendias, 2010). Los aniones S^{2-} y CO_3^{2-} también participan en procesos de precipitación de Cd (Naidu et al., 1997). Se ha documentado la formación de complejos estables de Cd con aniones cloruro, los cuales aumentan la solubilidad de Cd en suelo, por ejemplo CdCl^+ y CdCl_2 (Robinson et al., 2006). La materia orgánica también forma complejos con el Cd^{2+} , pero más débiles que con el Cu^{2+} (Adriano, 2001).

5.3 Cd en planta

El Cd es uno de los elementos más tóxicos que produce efectos perjudiciales en todos los procesos biológicos de los seres vivos. La movilidad del Cd desde el suelo a la parte comestible de las plantas es rápida, y se pueden acumular grandes cantidades de Cd en los tejidos vegetales sin que la planta sufra estrés (Oliver, 1997). La toxicidad del Cd se debe a que puede sustituir al

Zn en procesos metabólicos a nivel celular y alterar la homeostasis de Zn, Ca y Fe (Verbruggen et al., 2009). Presenta una fuerte afinidad por grupos sulfhídricos, por ejemplo con metalotioneinas y fitoquelatinas, por lo que el Cd aparece en planta asociado a proteínas (Mendoza-Cózatl et al., 2008). Al igual que el As(III), puede disminuir la cantidad de glutathione reducido a través de la formación de Cd-glutathione y así limitar la capacidad antioxidante de la planta

Es un elemento no esencial en la nutrición de las plantas. Se ha observado que puede absorberse por la planta de forma pasiva, pero también metabólicamente. La absorción ocurre principalmente a través de transportadores de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} . El más estudiado es el transportador de alta afinidad de Fe ZIP IRT1 (Mendoza-Cózatl et al., 2011).

Thlaspi caerulescens también ha sido reconocida como planta hiperacumuladora de Cd, que además requiere Cd para un crecimiento óptimo y promueve la actividad de la anhidrasa carbónica, necesaria para la interconversión de CO_2 y HCO_3^- (Liu et al., 2008).

CAPÍTULO I.2

BIO/DISPONIBILIDAD DE ELEMENTOS TRAZA. TÉCNICAS PARA SU EVALUACIÓN

La composición química de la disolución del suelo es de gran importancia para entender el comportamiento de los elementos contaminantes y su disponibilidad para las plantas.

La solubilidad es un parámetro que permite evaluar la movilidad de metales y metaloides en el suelo. La disolución del suelo se define como la fase líquida acuosa junto con sus solutos (Tiensing et al., 2001). Es un sistema dinámico y móvil y se encuentra en íntimo contacto con la fase sólida del suelo. La composición de la misma depende de varios factores, entre ellos de la estructura del suelo, el pH, la fuerza iónica, la complejación de iones por ligandos, la competición entre iones por las posiciones de cambio en el suelo y el contenido y tipo de materia orgánica (grado de polimerización, grupos funcionales, estabilidad, carbono orgánico disuelto). En el laboratorio, la técnica de extracción es determinante para la composición química resultante. Se sabe que existen diferencias significativas químicas y ecotoxicológicas en la composición de la disolución del suelo extraída por diferentes métodos, como por ejemplo en la extracción con disoluciones o extracción física al vacío con rizosondas (Tiensing et al., 2001).

Uno de los objetivos de esta Tesis es conseguir la reducción de la disponibilidad de arsénico y metales pesados en el suelo para la planta y otros organismos presentes en él, mediante el uso de plantas, enmiendas o la combinación de ambas. Al tratarse de una cuestión de relevancia, es preciso hacer algunos comentarios sobre el concepto de bio/disponibilidad de elementos contaminantes que existe hoy en día en la comunidad científica. Puesto que las plantas desempeñan un papel importante en esta Tesis, y son utilizadas como elementos para conseguir la reducción de la fracción disponible en el suelo, cabe destacar que en la bibliografía encontramos el término fitodisponibilidad como el concepto de disponibilidad de metales para las plantas (Song et al., 2004).

Factores determinantes de la composición química de la disolución del suelo

Según Fitz y Wenzel (2006) existen dos maneras de abordar el concepto de biodisponibilidad en la rizosfera. Por una lado, la fracción biodisponible de elementos traza es

aquella que puede ser potencialmente absorbida por las plantas y microorganismos, la fracción de elemento del total que es potencialmente accesible. Por otro lado es la cantidad de elemento que toman las plantas y los microorganismos. Esta última definición es la forma más precisa de definir el concepto, pero carece de valor predictivo y además no ha sido posible medirla. Es por ello que se opta por utilizar el primer enfoque como una aproximación del elemento disponible en el suelo.

En general, existe cierta controversia con respecto al término biodisponible, dadas las diferentes formas que existen para definirlo y para determinarlo cuantitativamente en el laboratorio. Sin embargo, en la literatura encontramos un consenso bastante amplio sobre el procedimiento de análisis de la fracción de elemento total. En primer lugar, se coincide en la existencia de una correlación bastante pobre entre concentración total en suelo y concentración en planta por un lado y entre concentración total en suelo y concentración de elemento extraíble en suelo por otro (Abedin et al., 2012). Este hecho sugiere que el uso del concepto elemento total no sea válido para la predicción de la biodisponibilidad de elementos traza en el suelo y puede conducir a errores cuando se requiere valorar el riesgo toxicológico para los seres vivos. No obstante, los valores genéricos de referencia para la clasificación de un suelo como contaminado se suelen basar en concentraciones totales de metales y su uso está extendido en las legislaciones de muchos países. En el caso español, en el Real Decreto 9/2005 de 14 de enero y la subsiguiente Ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados se indican los criterios para el cálculo de los niveles genéricos de referencia. Para las comunidades autónomas que no tengan establecidos niveles genéricos de referencia se establece que pueden tomar como valor el resultado de sumar a la concentración media, el doble de la desviación típica de las concentraciones existentes en suelos de zonas próximas no contaminadas y con sustratos geológicos similares. Como determina el Real Decreto, el resultado sería aplicable a cualquier uso del suelo atendiendo tanto a la protección de la salud humana como a la protección de los ecosistemas. La Comunidad de Madrid ha establecido los niveles genéricos de referencia para protección de la salud humana de metales pesados y otros elementos traza (Orden 2770/2006, de 11 de agosto, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio) obtenidos mediante aplicación de los criterios establecidos en el Anexo VII del Real Decreto 9/2005, de 14 de enero (Tabla 4).

Tabla 4. Niveles genéricos de referencia para protección de la salud humana de metales pesados y otros elementos traza. (Orden 2770/2006 de la CAM).

mg·kg⁻¹	Industrial	Urbano	Otros usos del suelo	VR90
Antimonio	80 ^b	8 ^b	0,8	0,48
Arsénico	40	24 ^a	24 ^a	24
Bario	100.000 ^c	15.200	4200	138
Berilio	13	2 ^a	2 ^a	2,1
Cadmio	300 ^b	30 ^b	3	0,22
Cobalto	1.500 ^b	150 ^b	15	12
Cobre	8.000 ^b	800 ^b	80	20
Cromo	2.300 ^b	230	90	32
Estaño	100.000 ^c	46.730	46.730	4,45
Manganeso	33.900 ^b	3.90	690 ^a	690
Mercurio	15	7	5	0,065
Molibdeno	1.500 ^b	150 ^b	15	0,7
Níquel	15.600 ^b	1.560	405	21
Plata	500 ^b	50 ^b	5	0,12
Selenio	3.900 ^b	390	85	0,24
Plomo	2.700 ^b	270	75	30
Talio	30 ^b	3	2	0,39
Vanadio	3.700 ^b	370 ^b	37 ^a	37
Zinc	100.000	11.700 ^b	1170	73

^a VR90 del elemento. ^b En aplicación del criterio de contigüidad.

Las concentraciones que aparecen en esa tabla son valores de concentración total. En el RD 9/2005 se ofrecen unas líneas para la determinación de los valores umbrales toxicológicos. Estos son los primeros pasos hacia la mejora y la complementación de estos criterios basados en el elemento total. La bibliografía suele incidir en la falta de aplicación de la concentración total para la determinación del riesgo que entrañan elementos traza en el medio, porque no tienen en cuenta la movilidad y la biodisponibilidad de los mismos (Lombi et al., 1998, Mench et al., 2003; Alvarenga et al., 2007). En cuanto a la cuantificación del elemento disponible, la raíz del problema asociada a la falta de acuerdo en la comunidad científica puede responder al hecho de que la biodisponibilidad no siempre se ha considerado un proceso dinámico y asociado a otros

muchos que tienen lugar en la matriz del suelo. Sin embargo, para poder realizar una predicción de la absorción de elementos por la planta deben entenderse los procesos que ocurren en la interfase de la rizosfera: suelo-planta-microorganismo. Los cambios de pH y de potencial redox, la absorción por la planta, la liberación de ácidos orgánicos por las raíces, los movimientos de difusión de iones, la complejación con otros iones, etc. pueden modificar significativamente la composición de la interfase suelo-raíz favoreciendo que metal(oide)s (co)precipiten, se inmovilicen, queden adsorbidos sobre la superficies de las partículas del suelo, de la raíz o de los microorganismos (Fitz y Wenzel, 2002). Como ejemplo de inmovilización, la formación de una fase sólida sobre la superficie de las raíces es un fenómeno que se ha observado para algunos metales, como por ejemplo la precipitación de Pb en forma de piromorfita (Cao et al., 2002). En cambio no se ha observado la formación de fases minerales definidas de arsénico sobre la raíz, aunque la formación de placa de hierro en las raíces de las plantas favorece la fuerte adsorción de arsénico sobre la misma, siendo más probable que la coprecipitación con el hierro (Blute et al., 2004). Incluso se ha demostrado la volatilización de determinados elementos en la rizosfera como el selenio, aunque para el arsénico los estudios sobre la formación de compuestos organoarsenicales volátiles en la rizosfera no son concluyentes, y, dado que la fracción de arsénico volatilizada supone una fracción minoritaria con respecto al total de arsénico soluble, ha sido ignorada por décadas ante la falta de procedimientos válidos para su determinación (Sadiq 1997; Mestrot et al., 2011).

Ante todas estas evidencias, la alteración de las condiciones bióticas y abióticas en la interfase suelo-rizosfera modifican las formas y la especiación en las que se encuentran los elementos de la fracción soluble del suelo, por lo que resulta de imperiosa necesidad estudiar muchos más parámetros y considerar el suelo como un sistema dinámico.

Métodos de extracción de la fase soluble del suelo

No existe un método reconocido como universal y estandarizado para la cuantificación de la disponibilidad de elementos traza, pero las técnicas más comunes son las que tienen su base en el uso de extractantes químicos. La efectividad de la disolución extractante depende de la posibilidad de obtener una predicción válida de la acumulación en planta del elemento traza en cuestión (Chen et al., 2009). Sin embargo esto no ocurre siempre como se pudiera desear. En numerosas ocasiones la concentración de elemento disponible no se correlaciona significativamente con el elemento absorbido por la planta o la correlación es demasiado pobre para poder asegurar que existe una relación entre ambas variables. Para ayudar a resolver este problema, los estudios se han centrado en evaluar el potencial de extracción de elementos traza

con varias disoluciones en un mismo suelo, con el objetivo de determinar cuáles ofrecen la mejor correlación con la concentración de elemento en planta. De acuerdo con Kabata-Pendias et al. (2004), las disoluciones extractantes deben tener poca reactividad con los componentes del suelo. De este principio deriva el uso de sales neutras como extractantes más empleados hasta la fecha, y que pretenden simular mejor las condiciones reales. Como ejemplos de sales neutras encontramos CaCl_2 , NaNO_3 , acetato de amonio, LiNO_3 o H_2O (Menzies et al., 2007; Abedin et al., 2012). Muchos autores apuestan por el uso de extractantes menos agresivos. Como ejemplos de disoluciones menos agresivas que otras de mayor capacidad extractante encontramos MgCl_2 1M, ácido acético 0,11 M, acetato de amonio 1M, EDTA-NH_4 0,05 M (Abedin et al., 2012). El uso de las sales neutras está limitado por las características del propio suelo, como el pH y la capacidad de intercambio catiónico del suelo, y por su contenido de diferentes fracciones sólidas (Stewart et al., 2003). Chen et al. (2009) determinaron que el potencial de extracción de Pb fue superior con agentes quelantes que con sales neutras o ácidos diluidos. Baraud et al. (2012) concluyeron que la extracción con HCl 0,25 M fue válida para predecir significativamente la fitodisponibilidad de Cd, Mn y Zn en plantas de rábano, mientras la extracción con EDTA 0,05M solo podía ser usada para la evaluación de la fitodisponibilidad de Cd. Estos son solo algunos ejemplos del amplio número de extractantes químicos de los que se puede disponer, si bien es necesario evaluar qué tipo de extracción es la más favorable en función de la caracterización del suelo objeto de estudio, aunque como Kabata-Pendias et al (2004) puntualizan, las soluciones extractantes deberían ser independientes de las propiedades del suelo, pero es bien sabido que las características del suelo definen el extractante idóneo que debiera utilizarse (Stewart et al., 2003). Una correcta caracterización de algunas propiedades básicas del mismo permite la optimización del método de extracción. Por ejemplo, la extracción con EDTA es apropiada para suelos ácidos y el método con DTPA es adecuado para suelos neutros o de alcalinidad baja (Lindsay y Norvell, 1978). Además, la efectividad de la extracción depende de la especiación química de los elementos traza (Meers et al., 2007b). Teniendo en cuenta todos los datos, existen determinados extractantes cuyo uso se ha extendido y gozan de buena aceptación. En general, el procedimiento de extracción con CaCl_2 es uno de los más versátiles y puede proporcionar una buena indicación de la fitodisponibilidad de metales (Pueyo et al., 2004; Meers et al., 2007b).

Hay autores que discrepan sobre la efectividad de la extracción química en la predicción de la fracción biodisponible de los elementos. Los métodos químicos están basados en principios de equilibrio y no tienen en cuenta procesos dinámicos que ocurren en la rizosfera, como hemos comentado anteriormente. Por ello, han sido bien aceptados otros métodos que se basan en la

simulación de condiciones similares a la rizosfera. Feng et al. (2005) ensayaron con mezclas de ácidos orgánicos de bajo peso molecular para extraer Zn, Cd, Cu y Cr en muestras de suelos procedentes de la rizosfera de plantas de trigo. Determinaron que la correlación entre metales en suelo y en planta (raíz y parte aérea) fue significativa, mientras que la extracción con otras disoluciones logró una correlación bastante pobre.

Nuevas técnicas de extracción de la fracción soluble del suelo

Los elementos traza que se extraen de la disolución del suelo, mediante absorción biológica por ej., pueden ser resuministrados rápidamente desde la fase sólida del suelo. Los métodos convencionales de disponibilidad son incapaces de obtener una medida directa o de cuantificar este flujo desde la fase sólida. En base a este criterio, se han llevado a cabo ensayos de predicción de disponibilidad de metales y nutrientes en suelos utilizando numerosos dispositivos. Entre ellos, los que ofrecen una visión más realista son las resinas en forma de cápsulas y membranas. Estos dispositivos se entierran en el suelo y extraen elementos desde la solución del suelo de forma continua. Los resultados se correlacionan bien con la cantidad absorbida por las planta, pero, debido a la propia geometría de la cápsula y a la capa de difusión, el flujo de la disolución del suelo a la resina no puede ser cuantificado y los resultados no pueden ser comparados con otros trabajos (Zhang et al., 1998).

Recientemente se ha puesto en marcha otra técnica *in situ* que sí permite la cuantificación del flujo fase sólida-disolución y por tanto la predicción de la biodisponibilidad de elementos contaminantes de manera más robusta. Esta técnica se presenta como una alternativa a la extracción química. Es conocida como “diffusive gradient in thin films” (DGT), una técnica que se introdujo hace casi 20 años y proporciona información sobre la dinámica de solutos en agua, suelo y sedimentos. El dispositivo se compone de un filtro de membrana, un gel difusivo y un gel de resina. Cuando se utiliza en la superficie de un suelo, simula la perturbación que crea la raíz en el suelo; la resina sirve de sumidero e induce la difusión de metales desde la disolución del suelo al gel difusivo. La principal ventaja que ofrece la técnica DGT frente a otras convencionales es que tiene en cuenta la concentración de la disolución del suelo y la dinámica de suministro de los elementos traza desde la fase sólida (Tian et al., 2008). La técnica ha obtenido éxito en la predicción de la biodisponibilidad de metales en numerosos ensayos con plantas cultivadas en tiestos (Zhang et al., 2001; Cornu and Denaix, 2006; Zhao et al., 2006), aunque hay autores que consideran que la DGT no es mucho mejor que las extracciones convencionales. Es necesario incidir en la mayor limitación de esta técnica hasta el momento. Se ha observado que los resultados en la predicción de la biodisponibilidad varían cuando las plantas crecen bajo el estrés

producido por toxicidad por metales (Almås et al., 2006 para Cd y Zn; Williams et al., 2012 para el Cd). Sin embargo, en función del objetivo que se quiera alcanzar los resultados pueden ser igualmente válidos. Williams et al. (2012) observaron este tipo de problema en plantas de arroz con Cd. Sin embargo, el objetivo marcado era determinar si los suelos eran aptos para el crecimiento de plantas de arroz, y aunque los resultados fueron enmascarados por el estrés producido en las plantas a causa de la toxicidad, se pudo asegurar que los suelos no eran adecuados para el cultivo de arroz. Además observaron que se consiguió una mejor predicción de la concentración de Cd en grano que la que se obtuvo con la solución del suelo obtenida por centrifugación. Como en cualquier técnica, no siempre se han observado resultados tan alentadores como los anteriormente mencionados. Por ejemplo se han encontrado correlaciones pobres entre el Zn lábil en suelo y su absorción por *Lupinus nanus* (Koster et al., 2005) o entre cobre en suelo y trigo (Nolan et al., 2005). Solamente han pasado dos décadas desde el inicio de la puesta en marcha de la DGT, por lo que sigue siendo necesaria la continuación de la investigación. Hasta ahora se reconoce que se trata de una herramienta bastante robusta para la predicción de la disponibilidad de metales, sobre todo en cultivos de arroz. Además, la investigación se ha centrado en gran parte en el estudio de elementos traza, pero cada vez más, la técnica está siendo usada para el análisis de otros componentes de la disolución del suelo como potasio y azufre en suelos agrícolas (Mason et al., 2012; Tandy et al., 2012) o fósforo (Six et al., 2012, Glæsner et al., 2012). Por ello es esencial llegar a un mejor conocimiento de las interacciones de estos componentes del suelo con el gel del dispositivo.

De entre las técnicas utilizadas en esta Tesis destaca la extracción del agua intersticial del suelo mediante rizosondas (Eijkelkamp, Holanda). Las rizosondas consisten en un tubo de 10 cm fabricado de un material polímero poroso, químicamente inerte e hidrófilo conectado a otro tubo de 10 cm de PVC y un conector Luer-Lock (L-L) macho. En el interior del tubo poroso y a lo largo de 5 cm del tubo de PVC se encuentra un cable de acero inoxidable de 15 cm de longitud. Las muestras se obtienen conectando un tubo de vacío a la rizona mediante una aguja insertada en el conector L-L. Las especificaciones técnicas muestran que con un tubo de vacío de 10 mL se consiguen extraer 7 mL en 1-16 horas, dependiendo de las propiedades del suelo. Se ofrece más información en la web <http://www.eijkelkamp.com/>. Las rizosondas son consideradas herramientas fiables en el análisis de metales de la disolución del suelo (Meers et al., 2007c) y su empleo ha sido recomendado para su uso en ensayos ecotoxicológicos (Tienings et al., 2001). Tradicionalmente, no se ha usado el agua intersticial del suelo para la evaluación de la biodisponibilidad, ya que como se ha comentado, el uso de extractantes químicos en este ámbito ha sido mayoritario, pero desde hace unos años hasta ahora se han publicado una gran

cantidad de trabajos en los que se emplea el agua intersticial del suelo para evaluar la movilidad de elementos traza en el suelo (Clemente et al., 2008; Hartley et al., 2009a, Beesley et al., 2010a; 2010b Karami et al., 2011). Según argumentan algunos autores, la fracción de agua que se puede extraer con las sondas probablemente representa la fracción de la misma que pueden tomar las plantas (Clemente et al., 2008). Como se ha demostrado, las soluciones de EDTA pueden extraer una mayor cantidad de metales varios órdenes de magnitud más elevados que los que se pueden encontrar en el agua intersticial del suelo (Di Bonito et al., 2008), por lo que la extracción mediante rizosondas parece resultar prometedora en la predicción de la fracción de elementos traza potencialmente absorbible por la planta. Sin embargo, como en cualquier método existe cierta controversia entre los resultados obtenidos por diferentes autores. Meers et al. (2007b) observaron que la extracción con rizosondas proporcionaba una correlación significativa entre la concentración de Cd en la disolución del suelo y en la planta (*Phaseolus vulgaris* cultivada en tiesto) pero no la encontraron para Ni ni para Zn. Clemente et al. (2012) no observaron una correlación significativa para As y metales en planta de *Atriplex halimus* L. en condiciones de campo.

Existe una gran variedad de técnicas a nuestra disposición, entre las que deberemos elegir la más adecuada para nuestros objetivos. Se considera necesario conocer *a priori* las limitaciones de todas las técnicas que deseemos utilizar para llegar a estimar el nivel de contaminación de un suelo. Vázquez et al. (2008) establecieron que los métodos de extracción con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1M (Wenzel et al., 2001) y la mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Feng et al., 2005) eran los se correlacionaron de manera más robusta con la concentración disponible de As, Cu, Fe, Mn y Zn en suelos contaminados con residuos mineros usando *Lupinus albus* L., y por tanto eran los recomendados para extracciones de elemento biodisponible en ese tipo de suelos. A partir de los trabajos de Vázquez et al. (2008) en suelos multicontaminados con arsénico y metales y su interacción con plantas mediterráneas, se ha decidido utilizar en esta Tesis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1M como extractante habitual. También se ha ensayado con las sondas de extracción, rizosondas, tras conocer las referencias que existen en cuanto a su aplicación y por las buenas correlaciones que ofrece en cuanto a las características ecotoxicológicas del suelo.

CAPÍTULO I.3

LA PROBLEMÁTICA DE LAS ZONAS MINERAS. LEGISLACIÓN DE LA GESTIÓN DE RESIDUOS MINEROS

Toda zona donde se ha llevado a cabo una actividad minera presenta ciertas áreas en las que la concentración de elementos tóxicos es más elevada. Son las denominadas zonas de escombrera y los suelos alrededor de ellas, donde permanecen los materiales remanentes de los procesos de extracción y de tratamiento de los minerales y menas.

Las escombreras presentan unas características comunes en todos los emplazamientos mineros (Krzaklewski y Pietrzykowski 2002; Ernst et al., 2005; Méndez et al., 2008):

- Una elevada concentración de metales, tales como Cd, Cu, Mn, Pb, Cr, Ni y Zn, y de metaloides como el As. La distribución de los elementos traza no es homogénea, sino que varía horizontal y verticalmente (Schwartz et al., 1999; Whiting et al., 2000). Los materiales que forman la escombrera son de gran tamaño, como guijarros y piedras, con una baja capacidad de retención de agua.

- El material presente en las escombreras ha perdido la estructura física propia de un suelo en condiciones naturales. Frecuentemente el material remanente se apila en áreas de pendiente elevada, lo que obstaculiza el establecimiento de la vegetación, el mantenimiento de una adecuada humedad en el suelo y facilita la erosión pendiente abajo.

- No contienen apenas materia orgánica ni macronutrientes como nitrógeno y fósforo.

- Habitualmente el pH del material es ácido, aunque existen escombreras con pH alcalino.

- La vegetación está prácticamente ausente. En zonas áridas y semiáridas, las bajas precipitaciones, las altas temperaturas y los fuertes vientos son un impedimento más para el establecimiento de la cubierta vegetal.

- La comunidad microbiana es extremadamente escasa en cuanto a riqueza de especies. Las bacterias autótrofas oxidantes de sulfuros y hierro son la especie dominante.

Las escombreras se encuentran habitualmente al aire libre, sometidas a procesos físicos y químicos a lo largo de décadas tras el cese de las actividades mineras, sin adoptar ningún tipo de

seguimiento ambiental. De esta manera, las escombreras se convierten en una fuente incontrolada de contaminación de elementos traza. En España existen numerosas minas cuyo mineral principal es la pirita. El arsénico normalmente está asociado a depósitos de azufre, por lo que en estos casos se encuentra formando parte de la arsenopirita.

¿Por qué es un problema para el medio ambiente y la salud humana?

La extracción de minerales y su procesamiento genera una gran cantidad de residuos y de subproductos no deseados que no tienen valor económico y que suponen una amenaza para la seguridad ambiental y la salud humana. Ya nos hemos referido a las principales características de una escombrera, con el riesgo que entrañan los posibles cambios producidos en su capacidad de retención de elementos contaminantes. En el pasado, los depósitos de residuos de extracción y tratamiento se construían generalmente en terrenos que no habían sido acondicionados para albergarlos, careciendo de recubrimientos impermeabilizantes. Algunas veces se solían utilizar zonas que habían sido previamente excavadas. El contenido es una mezcla de impurezas, elementos traza provenientes de procesos de trituración, machacado, flotación, separación por tamaños, etc. y residuos de compuestos químicos usados para el procesamiento de los minerales. Podemos encontrar escombreras al aire libre o también dentro de las propias minas, utilizando el material procesado como relleno en los huecos de las excavaciones o como muros de sostenimiento. Sin embargo, no sólo estas zonas, sino otras también, pueden convertirse en una fuente de contaminación:

- Igual que en cualquier otra actividad industrial, podemos encontrar equipos eléctricos que contienen compuestos orgánicos, como por ejemplo los bifenilos poriclorados (PCBs). Cuando el material eléctrico es abandonado en las inmediaciones de la mina, los contaminantes orgánicos pueden liberarse al medio. Por tanto, no solamente la fuente de contaminación procede de la movilización de elementos traza inorgánicos, sino también de compuestos orgánicos provenientes de otras fuentes distintas al propio mineral.

- Embalses superficiales, contruidos como estanques para la evaporación de agua o para procesos de limpieza.

- Agua altamente ácida, rica en metales: se forma como resultado de reacciones químicas con las rocas ricas en minerales de sulfuro, como por ejemplo la pirita, cuando entran en contacto con agua superficial o con agua del subsuelo. Las reacciones químicas pueden ocurrir de forma natural, cuando por procesos de erosión y meteorización, las superficies de las rocas ácidas quedan al descubierto y expuestas a procesos meteorológicos; o bien a través de las actividades de extracción, en las que el mineral queda expuesto a la acción del agua y el aire,

acelerando los procesos de oxidación que ocurren también cuando el mineral está confinado en la roca madre, pero mucho más lentamente.

Todas estas fuentes de contaminación pueden desencadenar una serie de riesgos medioambientales a tener en cuenta:

Sedimentación de la contaminación

La escorrentía superficial puede movilizar el material de las escombreras aguas abajo, lo que puede suponer, en casos extremos, la obstrucción de la corriente y provocar inundaciones en las inmediaciones, carreteras o zonas residenciales.

Como resultado de la preparación del terreno para permitir la actividad minera, los procesos de erosión en estas zonas pueden ser más acusados, debido por ejemplo a la eliminación de la vegetación para permitir el paso de la maquinaria, a la construcción de rampas de transporte, barreras de seguridad etc. Este tipo de erosión puede causar la sobrecarga de sedimentos y contaminantes en cuerpos de agua cercanos, lo que contribuiría a la bajada de pH y, simultáneamente, a contaminar otras zonas debido a la filtración del agua que contiene elementos traza.

Contaminación del agua

El agua ácida de drenaje causa algunos de los problemas más graves y de mayor impacto ambiental en las minas abandonadas. La oxidación de determinados minerales provoca como consecuencia la movilización de metales y la acidificación del agua. También los grandes volúmenes de compuestos ácidos utilizados para extraer los metales contribuyen a la acidificación del medio. Se sabe que las instalaciones mineras abandonadas pueden generar lixiviados ácidos durante más de 100 años. En consecuencia, se considera de obligada necesidad la preparación del terreno previamente a la instalación de todas las instalaciones mineras y un diseño de la zona de escombros mucho más sostenible para evitar el drenaje de lixiviados ácidos.

En el pasado, los escombros se depositaban en los márgenes de las corrientes de agua, porque son depresiones naturales, aprovechando la pendiente natural. Esto cargaba la corriente con metales y lixiviados ácidos. Por otro lado, cuando las actividades de excavación alcanzan la capa freática, existe un riesgo de filtración de las aguas ácidas hacia las aguas subterráneas.

Contaminación del aire

La contaminación del aire ocurre principalmente durante los procesos de excavación, de transporte y de molienda de las rocas. Las emisiones pueden ser en forma de polvo, olor y ruido. Las dos últimas son menos preocupantes, a menos que los materiales de residuos sean transportados por camiones cerca de áreas residenciales. Sin embargo, el polvo puede contener los mismos materiales que se encuentren en las rocas y minerales, incluidos metales (European Commission, 2009).

¿Qué/quién está afectado?

Los contaminantes afectan a la salud humana y promueven la creación de ambientes desfavorables para los seres vivos que habitan en las inmediaciones de las zonas de extracción minera. Para ilustrar este aspecto bastan algunos ejemplos:

Una de las grandes catástrofes medioambientales acaecidas en España corresponde al desastre de Aznalcóllar en 1998. Las paredes de la balsa que contenía residuos altamente contaminados cedió, liberándose alrededor de 5 millones de m³ de material ácido rico en metales a los ríos Agrio y Guadiamar (Madejón et al., 2002). El material contaminado formó una capa de 300-400 m de anchura y 40 km de longitud y de 2 a 30 cm de espesor de lodo negro en ambos lados de los ríos (Grimalt et al., 1999). La contaminación se extendió a lo largo de terrenos agrícolas y humedales, incluyendo 900 ha de especial importancia para las aves en 'Entremuros', considerada Patrimonio de la Humanidad. Inmediatamente tras el desastre se puso en marcha un procedimiento de emergencia mediante la eliminación mecánica de la capa de lodo así como de suelo ya contaminado, operaciones que duraron al menos seis meses. La monitorización de la contaminación ha sido continua desde la contaminación desde los suelos, demostrando que en los suelos en los que no se retiró el lodo, y aunque la vegetación haya crecido de manera espontánea, los elementos menos móviles han alcanzado 40 cm de profundidad mientras que los mas móviles como Cu, Cd y Zn han llegado a 1 m como consecuencia de la hidrólisis y oxidación de los sulfuros del residuo, de manera que la lixiviación de metales todavía continúa (Burgos et al., 2013). Si no se hubieran tomado medidas de estabilización de la contaminación, el escenario en toda el área afectada hubiera sido el anteriormente descrito.

Se monitorizó el seguimiento de la alimentación de las aves, que, sorprendentemente, continuaron alimentándose en la zona a pesar de las circunstancias, muestreando los dos macrófitos más abundantes (*Typha dominguensis* y *Scirpus maritimus*). Se observó que las

concentraciones de metales en el tejido vegetal eran mucho más elevadas que en plantas control, con concentraciones de Cd entre 3 y 40 y de Zn entre 20 y 100 veces superior (Meharg et al., 1999). Este ejemplo ilustra la introducción de contaminantes en la cadena trófica de aves, existiendo además otras muchas redes de alimentación que fueron perturbadas tras el desastre. Otra línea de investigación se centra en el daño genético sobre determinadas especies de aves (Pastor et al., 2001) y mamíferos (Tanzarella et al., 2001). Los resultados revelan que se produjo daño sobre el material genético, lo que puede desencadenar efectos perjudiciales en la reproducción y/o el aumento de la mortalidad, etc.

Otros accidentes fuera de España pero cercanos a nuestro país, son los ocurridos en Rumanía, en la mina de oro de Baia Mare en el año 2000, y el más reciente en el año 2010 en Ajka, Hungría. Con respecto al primero, se rompió el dique de contención donde se almacenaban residuos de la mina de oro de Baia Mare. Alrededor de 100.000 m³ de lodo y aguas residuales con altas concentraciones de cianuro llegaron al curso superior del Danubio y acabaron desembocando en el mar Negro. La pluma de cianuro podía medirse a 2.000 km del origen del vertido (Informe de la Comisión Europea, COM/2000/0664 final). Dicho vertido tuvo lugar en una zona históricamente contaminada con metales debido a su larga tradición minera. Se tenía conocimiento de concentraciones elevadas de metales pesados en algunos de los puntos que fueron posteriormente afectados por el vertido debido a las constantes fugas registradas en el pasado.

En el más reciente, en Hungría, alrededor de 700.000 m³ de lodo rojo y agua con un pH de 12 fueron vertidos hacia el valle del río Torna, inundando las partes más bajas de tres ciudades del oeste de Hungría (Devecser, Kolontar y Somlovasarhely). El desastre produjo la muerte de 10 personas, cientos de heridos y daños materiales irrecuperables. Junto con la tragedia humana, se estimó que alrededor de 800 ha de terreno agrícola fueron cubiertas con 5-10 cm de lodo rojo. Este material es un subproducto de la extracción de aluminio de minerales de bauxita. Por cada tonelada de alúmina se producen 0,5-2 toneladas de lodo rojo. Los factores que afectaron principalmente a la rápida degradación del suelo fueron el carácter alcalino y el elevado contenido de elementos traza del vertido (As, Cr, Cd, Ni, Pb, Zn). También existen riesgos para la salud humana derivados de la fina granulación del lodo rojo cuando se encuentra resuspendido. Sin embargo, el lodo rojo ha sido utilizado en ensayos de fitorremediación como material adsorbente de elementos (Bertocchi et al., 2006; Robinson et al., 2009). Los estudios que determinen el efecto tóxico del lodo rojo en el suelo siguen siendo escasos, probablemente debido a la falta de precedentes anteriores al accidente en Hungría (Ruyters et al., 2011).

Situación legal de la gestión de residuos mineros

Las minas que están en funcionamiento en la actualidad cuentan cada vez más con medios para el control de la dispersión de la contaminación y para la corrección y control del impacto ambiental. Sin embargo, el escenario no es tan alentador como parece y la realidad es otra distinta en determinados escenarios. En algunos países, las normativas ambientales no regulan la obligación de la gestión de los residuos mineros y de la remediación de las áreas afectadas por parte de las mismas empresas mineras, permitiéndose todavía el confinamiento de los residuos mineros en cuerpos de agua. Un dato demostrativo del problema que deriva del abandono de residuos inestables en la superficie terrestre señala que en el año 1995 se estimó que los escombros abandonados en superficie, cuyo origen fueron las actividades mineras de extracción, contuvieron alrededor de 700 millones de kg de metales (Warhust, 2000). En Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) estimó en 1997 la existencia de cerca de 200.000 minas abandonadas a lo largo de todo el país (USEPA, 2004a). En España, el Instituto Geológico y Minero (IGME) publicó en 2002 un catálogo de balsas y presas existentes en ese momento, siendo este el último listado elaborado por el IGME hasta la fecha (<http://www.igme.es/infoigme/aplicaciones/balsas/>). Como muestra la Figura 3, de 988 instalaciones en España (las que figuran en el listado), más de 500 estaban abandonadas y solamente 65 restauradas. En la Comunidad de Madrid (CAM), 31 se encontraban activas y 3 abandonadas. Son minas de las que se ha beneficiado principalmente el cobre, la plata, el plomo y el estaño. En el listado que se puede encontrar en la página web del instituto, se echan en falta las minas de la Cuesta de la Plata, entre ellas la mina Mónica, a pesar de su existencia desde el siglo XVIII.

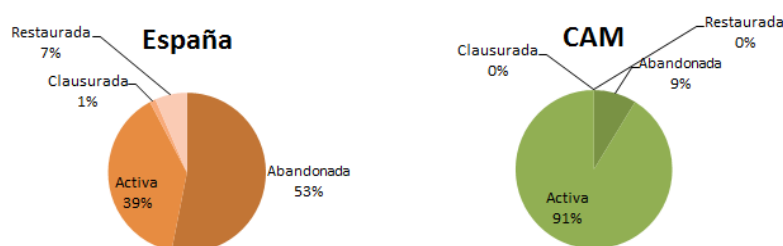


Figura 3. Catálogo de minas en España y en la Comunidad de Madrid (CAM). IGME, 2002.

En la Tesis Doctoral que lleva por título “La minería de los metales en la provincia de Madrid: Patrimonio Minero y Puesta en Valor del Espacio subterráneo” (Jordá, 2009, Universidad Politécnica de Madrid) aparecen recogidas en la memoria una mayor cantidad de minas en la Comunidad de Madrid que las que enumera el IGME. En la Tesis mencionada se

presentan al menos 58 emplazamientos, entre los cuales La mina Mónica aparece nombrada como mina Indiana. Cada uno de los emplazamientos mineros ha recibido una puntuación sobre 100 en base a determinados parámetros (estado de conservación, accesibilidad, época, interés docente, turístico y científico). La mina Mónica ha recibido una puntuación tal que merece ser rehabilitada puesto que supondría un atractivo para la localidad en la que se encuentra.

En la Unión Europea existe una directiva para regular la gestión de los residuos procedentes de actividades extractivas: “Directiva 2006/21/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2006 sobre la gestión de los residuos de industrias extractivas y por la que se modifica la Directiva 2004/35/CE”. Literalmente la Directiva establece lo siguiente:

La presente Directiva establece medidas, procedimientos y orientaciones para prevenir o reducir en la medida de lo posible los efectos adversos sobre el medio ambiente, en particular sobre las aguas, el aire, el suelo, la fauna, la flora y el paisaje, y los riesgos para la salud humana derivados de la gestión de los residuos de las industrias extractivas.

El artículo 5 establece las medidas a adoptar en la gestión de residuos en todas las fases de la explotación minera, antes, durante y después del aprovechamiento de los recursos mineros. Entre ellos cabe destacar el objetivo expuesto en el artículo 5.2 apartado c):

Garantizar la eliminación segura a corto y largo plazo de los residuos de extracción, para lo cual se tendrá en cuenta en la fase de proyecto la gestión durante la explotación de la instalación de residuos y después de su cierre.

Atendiendo al artículo 24, el objetivo marcado por la Directiva no se aplica a las instalación de residuos cerradas a 1 de mayo de 2008, por lo que los emplazamiento mineros antiguos, como el caso que nos concierne, están fuera del ámbito de aplicación de la Directiva, a pesar de que las escombreras forman parte de las zonas definidas como ‘instalación de residuos’ (artículo 3, apartado 15). A nivel nacional, la incorporación al ordenamiento interno español de la Directiva 2006/21/CE, sobre la gestión de los residuos de industrias extractivas, se ha llevado a cabo mediante el Real Decreto 975/2009, de 12 de junio, sobre gestión de los residuos de las industrias extractivas y de protección y rehabilitación del espacio afectado por actividades mineras. También se puede contar con la nueva ley sobre suelos contaminados, Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. Sin embargo encontramos un problema que puede ser complicado de resolver: las entidades explotadoras son las responsables de la gestión de residuos para su eliminación en cualquier caso. La mina Mónica, que fue abandonada en la década de los 70, estuvo trabajada por la Sociedad La Madrileña hasta 1867, momento en el que

deja de beneficiarse la plata. En un principio, a falta de responsabilidad por parte de una entidad explotadora, cabe preguntarse cuál es la persona física o jurídica encargada de la gestión de residuos conforme a la Directiva. El actual poseedor de los residuos de la mina Mónica es el Ayuntamiento de Bustarviejo, y de acuerdo con el artículo 11.1 de la Ley 22/2011 sería el responsable de los costes relativos a la gestión de residuos. En los últimos años el Ayuntamiento de Bustarviejo ha promovido la creación de un museo en la zona. Además desde el año 2011 es visible la mejora parcial de los caminos que suben a las escombreras y la instalación de paneles informativos sobre la historia de la mina y datos sobre los elementos abandonados en el exterior (puerta de la mina, torre del molino, piezas de equipos abandonados, etc.).

Como novedad respecto a la anterior Directiva 2004/35/CE, se establece la realización por cada uno de los estados miembros de un inventario de las instalaciones de residuos cerrados, incluidas las instalaciones de residuos abandonadas que tengan un impacto medioambiental grave o que puedan convertirse a medio o corto plazo en una amenaza grave para la salud de las personas o para el medio ambiente antes del 1 de mayo de 2012. Bajo ese criterio, el inventario se ha realizado y se puede encontrar en la Secretaria General de Minas del Ministerio de Industria. En el inventario aparecen 60 registros de zonas mineras clausuradas y abandonadas en España, pero ninguna en la Comunidad de Madrid.

(<http://www.minetur.gob.es/energia/mineria/Mineria/Paginas/Mineria.aspx>)

Un estudio conducido en el año 2001 por la agencia “Resources for the Future” en EEUU, destacó que el coste medio de la recuperación de cada emplazamiento contaminado podía ascender a 22 millones de dólares. Además, la falta de garantía financiera por parte de las empresas mineras excedía el coste en 1 billón de dólares a sufragar por las administraciones públicas (USEPA, 2004b). El coste por metro cúbico puede variar desde 1,50 a 450 dólares en técnicas de confinamiento con cemento o material rocoso. Sin embargo, técnicas como la fitoestabilización son capaces de reducir los costes desde 26 a 0,40 dólares por m³ (Ford y Walker, 2003). Como se detallará posteriormente, las estrategias convencionales de remediación de suelos mineros han ido perdiendo interés a favor de otras técnicas más respetuosas con el medio ambiente y con menos necesidad de inversión económica. Todas cuentan con sus limitaciones, pero en general el establecimiento de una técnica biológica es cada vez más aceptado. Dos son las opciones con más posibilidades de éxito: fitoextracción y fitoestabilización (Wong, 2003; Ernst, 2005). La clave de la recuperación de un emplazamiento minero es la de conseguir el establecimiento de una cubierta vegetal que sea capaz de sobrevivir a largo plazo, siendo sustancial que las especies de planta elegidas sean las idóneas para la zona minera en concreto. Estos criterios, a modo de resumen, son los resultados de décadas de

investigación científica en el ámbito de la recuperación de suelos contaminados. La Directiva Europea marca los principios generales que fundamentan las actividades de actuación en el marco de la gestión de residuos, pero no especifica las técnicas que se pueden llevar a cabo. Para ello, la Comisión Europea, ha redactado un documento con el título “Reference Document on Best Available Techniques for Management of Tailings and Waste-Rock in Mining Activities (2009)”. Cuenta con un capítulo en el que se exponen técnicas emergentes para el tratamiento de residuos procedentes de escombreras, como por ejemplo la utilización de lodo rojo para la absorción de metales en su matriz. Se centra sobre todo en la remediación de cianuro, posiblemente dada la gravedad del accidente ocurrido en las minas de oro de Rumanía. El término “fitorremediación” aparece en el apartado de conclusiones en cuanto a la remediación de emisiones de cianuro en minas de oro mediante el establecimiento de plantas de alta biomasa con capacidad para absorber cianuro. Sin embargo en el momento de la redacción de este documento, solo existía el planteamiento del proyecto, estableciendo que los resultados deberían exponerse en la próxima revisión del mismo. Actualmente no existe una fecha estimada para esta revisión (<http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/>). Esta es la única referencia que se hace con respecto a las técnicas de fitorremediación, aun teniendo en cuenta que el estudio en esta materia comenzó hace décadas y está comprobada su eficacia para ciertos escenarios. Las investigaciones han logrado obtener un conocimiento muy amplio sobre los mecanismos fisiológicos que participan en la extracción/estabilización de metal(oid)es y se han realizado multitud de experimentos en campo empleando plantas para la estabilización de contaminantes con resultados exitosos (Van der Lelie et al., 2001). Sin duda, el concepto y la aplicabilidad de la fitorremediación se deberían incluir de manera más extensa en la redacción de la próxima revisión de este documento.

CAPÍTULO I.4

FITORREMEDIACIÓN. ATENUACIÓN NATURAL

La fitorremediación es una técnica que nace como respuesta a la necesidad de eliminar contaminantes del suelo, especialmente metales, de manera respetuosa con el medio ambiente sin alterar la estructura original del suelo.

Existen alrededor de 1.400.000 puntos, solamente en Europa del Este, que están contaminados con metales procedentes del uso regular de pesticidas, fertilizantes y lodos residuales junto con metales provenientes de emisiones a la atmósfera por otras actividades tales como incineración y minería (McGrath et al., 2001). Como consecuencia de las normativas europeas sobre el reciclaje de residuos orgánicos, la acumulación de metales en el suelo tiene una tendencia al aumento, debido a que estos materiales pueden contener una cantidad significativa de elementos traza (Perez de Mora et al., 2006a). Los países industrializados han regulado la emisión de sustancias tóxicas al medio, pero la rápida industrialización de los países en desarrollo junto con la falta de control de la polución ha causado un gran incremento de metales pesados en suelos agrícolas.

La descontaminación de suelos que contienen elementos traza es un reto a nivel ambiental debido al carácter no degradable de metales y metaloides y a los riesgos asociados a su transferencia a aéreas no contaminadas junto con su introducción a la cadena trófica a través de la absorción por las plantas o directamente por ingestión. Es una cuestión inquietante que ha sido abordada desde varias perspectivas y no todas gozan de la misma aceptación social. Las técnicas *ex situ* como la descontaminación química, pueden llegar a destruir la estructura del suelo y además inactivarlo biológicamente, junto con el agravante del encarecimiento que supone la aplicación de estas tecnologías. Ante esto, la fitorremediación se planteó como una técnica prometedora en la que mediante el uso de plantas se podían limpiar grandes extensiones de terreno de contaminación moderada. En comparación con otras técnicas, esta es *in situ*, de bajo coste, socialmente bien vista y respetuosa con su entorno.

Deben tenerse en cuenta al menos tres factores a la hora de abordar la evaluación para la implantación de una tecnología de fitorremediación (Ernst, 1996):

- El grado de contaminación del suelo

- La biodisponibilidad del elemento traza
- La capacidad de las plantas para acumular metales en su parte aérea y/o estabilizarlos en la raíz

La fitorremediación es apta para tratar muchos tipos de contaminantes, entre los que se incluyen hidrocarburos, disolventes clorados, pesticidas, explosivos, metales pesados y radionucleidos. En muchos casos, la fitorremediación es el paso final en un proceso en el que se ha aplicado un tratamiento inicial a suelos con alto nivel de contaminación. En los casos en los que los niveles de polución sean moderados o bajos, la fitorremediación puede ser suficiente para llegar al objetivo marcado. En ella se engloban una serie de técnicas. En este capítulo se incluyen a continuación las más comunes:

Fitoextracción

La fitoextracción consiste en la utilización de especies vegetales que son capaces de acumular cantidades significativas de contaminantes en su parte aérea mediante su traslocación desde las raíces, con el objetivo de eliminarlos del suelo. Posteriormente, la parte cosechable debe ser recogida para recibir un tratamiento (incineración, compostaje y/o reciclaje, Prasad y Freitas, 2003).

Esta técnica tiene su mayor auge con el descubrimiento de variedades de plantas que pueden acumular grandes cantidades de elementos esenciales y otros no esenciales en su parte cosechable (Raskin et al., 1997). Son las llamadas plantas hiperacumuladoras, las cuales pueden llegar a almacenar un determinado elemento en una concentración superior al 1% de su peso seco. *Pteris vittata* fue la primera planta hiperacumuladora de arsénico descrita (Ma et al., 2001). Puede acumular hasta el 95% del arsénico absorbido del suelo en su parte aérea. También, *Thlaspi caerulescens* ha sido descrita como una planta hiperacumuladora de Zn y Cd (Lombi et al., 1999; Tu et al., 2002) y ha sido usada como modelo para estudiar los mecanismos de absorción, acumulación y tolerancia de metales junto con *Brassica juncea*. Las plantas hiperacumuladoras descritas hasta el momento extraen un metal específico y la gran mayoría solo Ni, mientras que las especies que acumulan Cu, Pb, Zn, o As son mucho menos numerosas (Do Nascimento y Xing, 2006). Los requisitos fundamentales que debe poseer una especie vegetal para que la extracción de elementos traza sea rentable se basan en un crecimiento rápido, alta biomasa, habilidad de acumulación de un amplio espectro de elementos traza en la parte aérea y que sea fácilmente cosechable (Seth, 2011). Un factor limitante y externo a la propia planta es el re-suministro de elementos traza desde la fase sólida del suelo a la solución del suelo. Efectivamente, para que la

absorción de elementos sea elevada, la actividad de los metal(oid)es en la solución del suelo y en las inmediaciones de las rizofera debe estar mantenida por un re-suministro rápido (Fitz et al., 2003; Lehto et al., 2006). Este re-suministro, o el tiempo de respuesta del suelo ante el agotamiento del elemento en la solución del suelo, está relacionado con la especiación de los metales en la fase sólida.

La baja producción de biomasa es una de las mayores limitaciones y restringe el tiempo de extracción, factor importante y decisivo a la hora de seleccionar esta técnica frente a otras más rápidas. Uno de los grandes avances a nivel científico para limitar o mitigar las barreras fisiológicas se ha obtenido en el campo de la ingeniería genética. Junto con la mejora de las prácticas agronómicas se han llegado a desarrollar variedades de plantas que reúnen los requisitos comentados anteriormente. El objetivo es el de conseguir cultivares más resistentes a la toxicidad, de mayor biomasa y con mayor habilidad de extracción, de manera que se pueda vencer la limitación del tiempo que suponía la fitoextracción (Clemens et al., 2002). La investigación se basa principalmente en la introducción y sobreexpresión de genes de plantas hiperacumuladoras a no acumuladoras relacionados con el metabolismo, absorción y transporte de elementos contaminantes. También se han llevado a cabo modificaciones en la sobreexpresión de los genes que codifican las proteínas para la síntesis de las fitoquelatinas, teniendo como objetivo el aumento de la tolerancia a metales, aunque no significa que una mayor tolerancia a elementos traza suponga una mayor capacidad extractora (Heiss et al., 2003). La manipulación genética comporta ciertos riesgos en el medio ambiente y a veces causa un impacto negativo sobre organismos no diana tales como con la transferencia no deseada de genes y la resistencia de las malas hierbas (Merkle, 2006). Todos los argumentos usados para demostrar que esta práctica tiene efectos beneficiosos en el ecosistema se ven ensombrecidos por la falta de información que existe a este respecto (Lövei, 2001). En Estados Unidos esta práctica goza de mayor aceptación por las administraciones, en cambio, en Europa la situación puede llegar a ser opuesta (Peuke y Rennenberg, 2005). Sin embargo en Europa se han llevado a cabo proyectos con árboles manipulados genéticamente. Concretamente, en Alemania, en los que se ha llevado a cabo la sobreexpresión del gen γ -ECS de *Escherichia coli* en álamos. El resultado fue que la variedad modificada sintetizó una mayor cantidad de glutatión en comparación con su variedad salvaje, junto con un aumento en su capacidad de extracción de Cu (Peuke y Rennenberg, 2005). Además se observó que la variedad transgénica era genéticamente estable, aunque son resultados preliminares, y sin ninguna duda es necesario un mayor estudio de los posibles riesgos para el medio ambiente y para la salud humana. Los científicos que abogan por el uso de la modificación genética defienden que el riesgo es muy bajo puesto que

los cultivos que se manejan no son comestibles, no llegan a la edad reproductiva en todo el ensayo y las flores son femeninas por lo que no producen polen.

Existe un debate que continúa en la actualidad sobre los mecanismos por los que las plantas hiperacumuladoras absorben metales y toleran altas concentraciones de elementos traza. Además no existe un claro consenso sobre el papel que tienen altas concentraciones de metales en la supervivencia de estas plantas. Entender los procesos fisiológicos determinantes de la hiperacumulación sería de gran ayuda en el campo de la manipulación genética. Como hemos visto, algunos de los procesos de la transferencia de genes no se traducen en un incremento de la capacidad extractora, por lo que la investigación de los mecanismos en los que se basa la hiperacumulación y su aplicación en la manipulación genética posibilitaría avanzar más eficazmente en el desarrollo de esta área de investigación.

Sin bien existen limitaciones éticas y legales que impiden el desarrollo de la técnica, todavía se argumenta sobre la liberalización de las leyes que dificultan la puesta en marcha de la modificación genética, a pesar de que se cuenta con herramientas científicas para poder ser llevada a cabo. Se cuestiona su efectividad, la mejora en comparación con las variedades no modificadas y la verdadera necesidad de su aplicación en fitorremediación teniendo en cuenta la existencia de técnicas que no utilizan modificaciones genéticas que gozan de éxito en campo.

Fitoestabilización

Es el uso de plantas para conseguir disminuir el riesgo de movilización y transferencia de los contaminantes, por ejemplo mediante la acumulación de elementos traza en la raíz o mediante su precipitación en el suelo (Peer et al., 2006). Las plantas que crecen en los emplazamientos contaminados ayudan a estabilizar el suelo reduciendo la dispersión de elementos traza por aire o agua además de evitar un contacto directo entre los contaminantes y los seres vivos.

Uno de los mecanismos fisiológicos de gran importancia en la fitoestabilización es la liberación de compuestos químicos por las plantas (Kidd et al., 2009). La rizosfera es un medio que se modifica continuamente por la interacción planta-suelo-microorganismo y su acidificación es un proceso determinante en la in/movilización de elementos traza. Los compuestos excretados por las raíces (aminoácidos, ácidos carboxílicos, azúcares, flavonoides, fenoles) pueden formar complejos estables con metales catiónicos y modificar su disponibilidad en el suelo. La fitoextracción ha sido desplazada progresivamente por la fitoestabilización, de forma que la mayoría de los trabajos en fitorremediación en los que no participa una especie hiperacumuladora contemplan la fitoestabilización como la técnica principal.

Fitovolatilización

Los elementos contaminantes se absorben a través de las raíces, son transportados a las hojas y volatilizados a la atmósfera por los estomas (Davis, 1998). Esta técnica ha sido demostrada para Hg, Se y As en el sistema planta-microorganismo (Brooks, 1998). La fitovolatilización de Hg ha sido conseguida mediante ingeniería genética, mientras que la de Se ocurre de forma natural. También existen experiencias exitosas en la volatilización de Se en plantas modificadas de *B. juncea* (Bañuelos et al., 2005), donde a pesar de que la acumulación de Se fue más elevada en el caso de las plantas transgénicas, la volatilización no fue significativamente mayor que en las variedades no modificadas. La ingeniería genética también ha conseguido mejorar los procesos de fitovolatilización de Hg en la planta, como por ejemplo con la manipulación del gen *merA*, responsable de la codificación de la mercurio-reductasa, que induce la reducción de Hg^{2+} a formas menos tóxicas y volátiles de mercurio elemental (Fox et al., 1982). La volatilización de As ocurre también de forma natural, aunque se dispone de poca información y los datos existentes hasta el momento se encuentran en discusión. En cuanto al As, se sugiere que la biometilación de arsénico es un proceso de detoxificación llevada a cabo por microorganismos. Para este proceso se requiere la reducción de arseniato a arsenito y posteriormente la metilación. Algunos estudios muestran que en ausencia de raíces en el suelo, la concentración de compuestos de arsénico volátiles no fue más de 1% del arsénico total del suelo (Prohaska et al., 1999). Turpeinen et al. (2002) determinaron que el arsénico volátil en forma de trimetilarsina, TMA, fue menos del 0,5% del arsénico soluble del suelo en el suelo en condiciones de campo en las propias escombreras.

Rizofiltración

La rizofiltración elimina elementos contaminantes del agua. La absorción o adsorción de estos elementos requiere que el área superficial de las raíces sea elevada. *Brassica juncea* y *Helianthus annuus* son dos especies de planta terrestres que han sido utilizadas en cultivos hidropónicos para estudiar la capacidad remediadora de esta técnica, obteniendo buenos resultados en la extracción de Cu, Cd, Ni, Pb y Zn de disoluciones acuosas (Dushenkov et al., 1995).

Antes de seleccionar una tecnología de fitorremediación hay que tener en cuenta determinados factores que afectarán al logro de la misma. Como se ha enfatizado al comienzo del capítulo, la concentración total y la biodisponible de elemento, el tipo de contaminación, la

capacidad extractora o estabilizadora de las plantas, son factores determinantes en la elección de la mejor práctica posible. La atenuación natural posterior a la fitoestabilización de contaminantes es la opción más viable hasta el momento desde el punto de vista práctico.

Nuevas técnicas y nuevos términos. Necesidad de la normalización de conceptos

Tras realizar una búsqueda bibliográfica es evidente que existe una gran cantidad de términos para definir el uso de plantas para la remediación de suelos contaminados. El avance en la investigación hace irremediable la aparición de tantos términos para definir y tratar de diferenciar con la terminología más precisa unas técnicas de otras, y aunque las diferencias no sean muchas el término puede cambiar para matizar lo que a otra técnica le puede faltar. En algunos casos la abundancia de tanta terminología puede ser necesaria, aunque en otros puede llevar a confusión incluso entre los propios científicos, al igual que dificulta su aceptación comercial. Ejemplos son la múltiple terminología para definir la degradación de contaminantes mediante procesos que ocurren en la rizosfera. Podemos encontrar rizodegradación, biorremediación en la rizosfera, degradación asistida en la rizosfera, biodegradación in situ o biorremediación asistida. También ocurre lo mismo con los términos fitoestabilización y fitoinmovilización.

Aunque se pueda justificar científicamente, la distinción entre términos tan concretos en el mercado no es viable, de ahí la necesidad de normalizar la terminología y no solo para su comercialización, sino también para evitar confusión en la propia comunidad científica.

Recientemente, un nuevo término con el nombre “phytomanagement” ha logrado introducirse en el amplio grupo de la terminología que se puede encontrar. Esta tecnología reúne los principios de otras tantas, es decir, engloba a un conjunto de técnicas que combinadas manipulan el sistema suelo-planta con el fin de remediar suelos contaminados. La principal diferencia con respecto a otras consiste en la obtención de productos vegetales de valor para la industria, como por ejemplo madera o energía (Conesa et al., 2012).

La técnica conocida como “phytomining”, incluida dentro de las técnicas “phytomanagement”, consiste en el uso de plantas hiperacumuladoras de altos niveles de metales de elevado valor, como oro y níquel. Podría sustituir muchas formas de minería tradicional para las que las concentraciones de los metales es demasiado baja y la rentabilidad económica es inviable (Peer et al., 2006; Robinson et al., 2009). Como ejemplos de experiencias de “phytomining” exitosas son las que utilizan plantas hiperacumuladoras de Ni del género *Alyssum*, las cuales ya han sido comercializada como una técnica de “phytomining” con grandes beneficios económicos (Chaney et al., 2007; Sheoran et al., 2009).

La atenuación natural, definida por la USEPA (1999), es el uso de procesos naturales *in situ* para impedir la propagación de la contaminación y reducir la concentración y la cantidad de contaminantes en áreas donde hay elementos traza (Declercq et al., 2012). Es una técnica consolidada en Estados Unidos y que ha ganado fuerza actualmente en Europa; en muchos casos puede ser la opción más realista y la que goza de mayor grado de aplicación. Aunque los procesos naturales no resuelvan en su totalidad el problema de la contaminación, puede ser la mejor técnica practicable en algunos lugares donde la contaminación es muy elevada, siempre y cuando no suponga un riesgo para el medio ambiente (Hartley et al., 2012). Además, la restauración de muchos emplazamientos es inviable económica y tecnológicamente, por lo que la atenuación natural se presenta como una alternativa bastante atractiva. En esta técnica se incluyen procesos de degradación biológica, volatilización, dispersión, dilución, reducción de la vida media radioactiva de isótopos, adsorción/absorción de los elementos contaminantes en la materia orgánica y partículas minerales del suelo (Mulligan y Yong, 2004). La atenuación natural ocasionalmente se usa aislada y suele aplicarse en combinación con otros procesos remedidores (Brown et al., 1994), puesto que los procesos biológicos suelen ser bastante lentos y la adición de enmiendas al comienzo puede acelerarlos y mejorarlos (Moreno-Jiménez et al., 2009). Recientemente ha aparecido un nuevo término en relación con la atenuación natural. Se trata de la atenuación natural monitorizada (Monitored natural attenuation). La monitorización de la contaminación a largo plazo es absolutamente necesaria puesto que se debe asegurar que el riesgo para la salud humana y el medio ambiente sean nulos. Los protocolos que se han desarrollado hasta ahora se han centrado sobre todo en la monitorización de contaminantes orgánicos en el agua, puesto que la atenuación natural ha estado más focalizada en este tipo de contaminantes desde sus inicios en la década de los 90. A diferencia de la atenuación natural, explicada como la simple existencia de determinados procesos en el medio, el concepto de atenuación natural monitorizada se basa en la confianza sobre los procesos que intervienen en la atenuación natural sólo si llegan a alcanzar los objetivos propuestos en la remediación de los suelos en un periodo de tiempo razonable (Declercq et al., 2012). Actualmente, en Europa existen diferentes protocolos de actuación (como por ej. análisis de consumo de oxígeno en el agua, nitrato, sulfato y la producción de Fe(II), Mn(II) y metano, NRC, 1993), pero hay países en los que no se aplica, y países en los que la atenuación natural monitorizada no es admitida como una técnica de remediación. Como ejemplos en España, cabe destacar las actividades llevadas a cabo en el Corredor Verde en Aznalcóllar (Sevilla) donde la atenuación natural, conjuntamente con la aplicación previa de técnicas de fitoestabilización, ha permitido el crecimiento de especies autóctonas que se plantaron cuando ocurrió el vertido de

residuos mineros arsenopiríticos en el año 1998. El Corredor Verde del río Guadamar es un claro ejemplo de implantación de un programa de fitogestión (phyomanagement) a gran escala donde la atenuación natural se ha implantado exitosamente. Ha sido uno de los programas con mayor volumen de actividades de remediación en Europa, a lo largo de toda el área afectada (aproximadamente 55 km²) con plantas nativas de tipo leñoso (Domínguez et al, 2008). La atenuación natural ha sido un éxito en esta zona, confirmando además que la extractabilidad de elementos traza disminuyó a lo largo de los años en los que la fase de atenuación natural estaba implantada. Clemente et al. (2006) evaluaron determinados parámetros en la fase de atenuación natural tras dos años de aplicación de técnicas de fitorremediación. En la fase de atenuación natural, los cultivos no se sometieron a ningún tipo de tratamiento y se permitió el crecimiento espontáneo de plantas en la zona de estudio. Se observaron procesos de fijación o adsorción de metales en el suelo, el aumento de la actividad microbiana y la mejora de la fertilidad del suelo, favorecido por la adición previa de enmiendas durante la fase remediadora. Vázquez et al. (2011) observaron tras siete años desde el cultivo de plantas, la disminución de las concentraciones extraíbles de As, Zn y Mn en los suelos procedentes de Aznalcóllar. Hay que puntualizar que los resultados obtenidos han sido posibilitados gracias a las actividades previas realizadas, como la retirada de la espesa capa de contaminación y la adición de enmiendas, lo que ha beneficiado el establecimiento de condiciones favorables para la flora y la actividad microbiana. Estos hechos reafirman que la atenuación natural no se usa de manera aislada, y si es así, es poco frecuente.

Limitaciones para la entrada de la fitorremediación en el mercado europeo

Desde los inicios del desarrollo de las técnicas de fitorremediación, en especial de la fitoextracción, se ha hecho hincapié en sus limitaciones. El tiempo necesario para remediar suelos con un alto nivel de contaminación es muy elevado. Algunos autores han determinado que solamente se podría retirar del suelo menos del 1% de metal en un siglo (Ernst, 1996). Las plantas deben ser resistentes a los metal(oid)es presentes en el suelo, y aun así, su capacidad de extracción está restringida a la producción de biomasa. La investigación en el campo de la remediación ha llevado a descartar la fitoextracción aislada, puesto que el tiempo de extracción requerido es demasiado alto y las perspectivas económicas no son tan ventajosas. Ha habido un giro progresivo de la fitoextracción hacia la fitoestabilización, considera una técnica más prometedora que la fitoextracción (Dickinson et al., 2009), en especial la fitoestabilización asistida con la adición de materiales al suelo (Van der Lelie et al., 2001). La mayoría de las plantas que crecen en suelos metalíferos no son acumuladoras sino exclusoras. Estas plantas son la base de la fitoestabilización.

Hasta ahora, el éxito de la introducción de las fitotecnologías en el mercado europeo ha sido escaso, a diferencia del norteamericano. A pesar de que en ambas regiones existe financiación, Estados Unidos ha avanzado más desde la experiencia y la aplicación, incluso dentro del ámbito académico, mientras que en Europa el eje conductor ha sido la investigación del estudio de los principios básicos de la fitorremediación. Este hecho se ha visto traducido en una industria mucho más experimentada en Estados Unidos, a pesar de que en Europa se han desarrollado programas financiados por la Comisión Europea, como por ejemplo el 5º Programa Marco (1999-2002) con la creación de numerosos proyectos en el campo de la aplicación. La otra diferencia entre ambos mercados radica en el tipo de financiación. En Europa la financiación es aportada mayoritariamente a través de la aprobación de presupuestos a nivel nacional o regional, mientras que la financiación privada ha sido siempre bastante limitada. Otras limitaciones apuntan a la falta de aceptabilidad por parte de la opinión pública, a la competencia con técnicas más rápidas que aseguran el mantenimiento de su éxito a largo plazo, y por otro lado a los derechos de propiedad como ocurre en Estados Unidos, lo que puede dificultar la aplicación de técnicas ya confirmadas como exitosas. La terminología es abundante y es un añadido a la dificultad para la introducción de estas técnicas en el mercado. Quizás una terminología más atractiva ayudaría a su entrada en el mercado y facilitaría el trabajo a las personas no especializadas que no están familiarizadas con todos los términos.

En el año 1998 Europa fue pionera en el establecimiento de una iniciativa basada en la creación de una red de cooperación en ciencia y tecnología entre diferentes países bajo el marco de acción COST 837. El principal objetivo es la eliminación de barreras que dificultan la cooperación entre investigadores de Europa, facilitando el desarrollo de ideas e iniciativas en todas las disciplinas científicas. El enfoque es totalmente interdisciplinar y este programa pretende atraer a investigadores de todos los ámbitos científicos.

La pregunta es si la fitorremediación es realmente comercializable. Tras varias décadas de investigación intensa ahora es necesario perfeccionar el atractivo de esta tecnología consiguiendo que sea más admisible por la opinión pública. Conesa et al. (2011) proponen la obtención de productos de valor añadido, tales como la bioenergía, biochar y la explotación de los cultivos biofortificados. Si se consigue obtener productos económicamente rentables en un área contaminada, en la que *a priori* no existen beneficios (minas abandonadas, vertederos), la aprobación global sería mayor y el proyecto tendría un mayor grado de viabilidad.

CAPÍTULO I.5

ENMIENDAS PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS MULTICONTAMINADOS

La estabilización de contaminantes en el suelo puede conseguirse mediante la adición de enmiendas que adsorben, complejan o precipitan elementos traza. La aplicación de enmiendas al suelo se ha centrado en el estudio de la inmovilización de elementos individuales, aunque cada vez más la investigación se orienta a emplear materiales que permitan remediar suelos multicontaminados.

Existen prácticas de eliminación de elementos contaminantes que se han convertido de forma progresiva en técnicas menos atractivas debido a su alto coste y/o a su carácter disruptivo del medio. Estas consisten en la retirada del suelo contaminado mediante excavación, confinamiento o en su reemplazamiento por suelo no contaminado. El avance de técnicas de remediación más rentables y más medioambientalmente sostenibles ha despertado gran interés. Entre otras se incluyen técnicas biológicas de remediación *in situ* como las comentadas en el anterior capítulo de fitoestabilización; otras como la estabilización física y química y vitrificación; y otras como la aplicación de materiales que reducen la movilidad y biodisponibilidad de elementos traza. En este último caso se trata de una estabilización química que produce cambios en la movilidad de elementos traza al añadir un determinado material o un conjunto de ellos, lo que se denomina una enmienda.

Los procesos que tienen lugar tras la adición de enmiendas al suelo se basan en la inmovilización de contaminantes mediante procesos de adsorción, absorción, complejación o (co)precipitación. Teniendo en cuenta que técnicas como la fitoextracción no son viables en determinados emplazamientos, como zonas mineras en las que la concentración de contaminantes es muy elevada, son más realistas otras opciones, tales como la fitoestabilización asistida (Méndez y Maier, 2008), término acuñado para referirnos a la fitoestabilización *in situ* con la aplicación de enmiendas. La elección de las dosis de enmiendas debe realizarse con cautela y tras haber realizado ensayos previos en escalas menores a las de campo, puesto que debido al carácter multicontaminado de muchos emplazamientos mineros, se puede llegar a

movilizar alguno de los elementos presentes si no se estima con precisión la interacción entre dichos elementos y la enmienda.

El número de publicaciones científicas en los que las enmiendas son el foco de estudio ha aumentado en los últimos años, demostrando que esta técnica goza de mayor aprobación, ya sea por la eficacia y la sencillez de la misma, por la necesidad de revalorizar subproductos industriales, por su carácter no destructivo o porque contribuye a la creación de un medio favorable para la actividad biológica y ayuda a mejorar las propiedades físico-químicas del suelo. La web www.sciencedirect.com permite realizar una búsqueda de los artículos científicos publicados en los últimos años. Se procedió a introducir tres palabras clave: “amendment” AND “soil” AND “metal”. La búsqueda dio como resultado 1969 documentos publicados desde el año 1979, con un índice h de 80 (80 documentos al menos han sido citados 80 veces). Como se observa en la Figura 4, el número de publicaciones ha ido aumentando gradualmente en el tiempo.

La incorporación de materiales al suelo no es una técnica reciente. No hay datos mostrados en la Figura 4, pero existen publicaciones anteriores a la década de los 90, e incluso antes de la década de los 70. El aporte de enmiendas, especialmente residuos orgánicos, a suelos agrícolas se lleva realizando siglos, con la finalidad de aumentar y mejorar la producción agrícola incrementando la reserva de nutrientes en el suelo y disminuyendo la biodisponibilidad de elementos tóxicos para los cultivos (Bolan et al., 2003). De aquí podemos deducir que la adición de enmiendas en el ámbito de emplazamientos contaminados parece derivar de su aplicación a nivel agrícola.

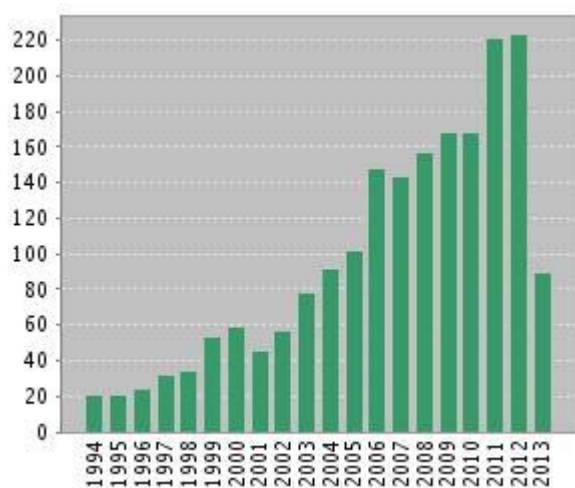


Figura 4. Evolución del número de publicaciones científicas sobre utilización de enmiendas en suelos con metales pesados. Fuente: www.sciencedirect.com

Para denominar este tipo de técnica disponemos de numerosos términos. Uno ya mencionado y que se encuentra de manera frecuente en la bibliografía es el de estabilización/inmovilización *in situ* de contaminantes, estabilización química o uso de enmiendas para remediación. Adriano et al. (2004) propusieron un término nuevo: “remediación natural asistida”. Con este nombre se refieren a la adición de materiales de bajo coste que optimizan y aceleran la inmovilización de metales por procesos de adsorción, precipitación, complejación y reacciones redox, disminuyendo la fracción biodisponible y reduciendo el riesgo de lixiviación. Es una definición que recoge de manera fiel el objetivo que se desea alcanzar al añadir un material al suelo. La elección de una enmienda apropiada para la remediación de suelos contaminados depende de varios factores, entre ellos, de las propiedades físico-químicas del suelo, del tipo y nivel de contaminación, del contenido de materia orgánica, de la necesidad de encalado, del uso del suelo, etc. Se ha de prestar especial atención a los emplazamientos con multi-contaminación, como los que contienen arsénico y metales pesados o contaminantes orgánicos e inorgánicos. Es de especial importancia en el caso de los metales y metaloides como el arsénico, tener en cuenta su afinidad por las partículas del suelo, lo que se traduce en el estudio de la afinidad de los elementos por las partículas del suelo tales como óxidos, fosfatos, sulfuros, etc. (Kumpiene et al., 2008).

Los lodos procedentes del tratamiento de aguas residuales han sido intensamente utilizados para mejorar las propiedades físico-químicas del suelo y mantener unos niveles nutricionales adecuados para los cultivos. Al considerarse una fuente de liberación lenta de nutrientes poseen cierto valor añadido (Wong, 2003). Sin embargo, estos materiales contienen metales pesados que, al adicionarse al suelo, contribuyen al aumento de la cantidad de metales existentes. Los metales más comunes que están presentes en lodos de aguas residuales son Cd, Cr y Ni. Además, se caracterizan por poseer un alto contenido de materia orgánica, y en el campo de la fitorremediación encontramos numerosos trabajos en los que se añaden a suelos mineros para retener metales siempre con la recomendación de añadir las dosis con precaución y conocimiento para no sobrepasar el límite de metales pesados establecido por ley (Sastre Conde et al., 2007; Renella et al., 2008; Alvarenga et al., 2008a). Por otro lado, también encontramos los lodos de residuos sólidos municipales (Alvarenga et al., 2009). En ocasiones, los lodos, tanto de sólidos municipales como de aguas residuales, se combinan con otros materiales. La mezcla más común se realiza con materiales alcalinos.

La producción ganadera también ha generado un gran volumen de residuos sólidos y líquidos tales como el estiércol de ganado y aves de corral (Park et al., 2011). Con tecnologías más avanzadas en procesos de tratamiento y descontaminación de aguas residuales y mejoras

en la dieta de alimentación en la industria de producción animal se ha conseguido reducir el nivel de elementos contaminantes en los residuos que se generan en estas industrias. En general, todos los residuos orgánicos deben recibir el tratamiento necesario para que las características físico-químicas del material resultante se ajusten a las normas establecidas en la legislación en cuanto a parámetros medioambientales. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los inorgánicos (la mayoría metales) pueden persistir en el suelo dado que no están sometidos a degradación química o biológica. Existe una legislación muy amplia en cuanto a límites permitidos de contenido de metales en compuestos orgánicos e inorgánicos que se aportan al suelo (Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes; Real Decreto 865/2010, de 2 de julio, sobre sustratos de cultivo) y que persiguen protegerla salud humana y del medio ambiente.

Se ha demostrado la gran afinidad que presenta el arsénico por las superficies de óxidos de Mn, Al y sobre todo Fe (Smedley y Kinniburgh, 2002; Zhao et al., 2009; Miretzky y Cirelli, 2010), que adsorben aniones como el arseniato formando arseniato de hierro(III) amorfo ($\text{FeAsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Carlson et al., 2002). La goetita (Hartley et al., 2008), la hematita (Artiola et al., 1990), los hidróxidos de Fe amorfo o el hierro elemental como el hierro en polvo o laminado (Vangronsveld et al., 2009), son ejemplos de sólidos que contienen hierro sobre los que ocurren procesos de adsorción y desorción de arsénico en el suelo. Por ello es frecuente la adición de sólidos de hierro al suelo para favorecer su retención. La adición de óxidos de Fe, fosfatos, carbonatos y arcillas favorece la retención de Cu haciéndolo precipitar como carbonatos y oxihidróxidos de Cu además de facilitar procesos de intercambio de iones y formación de complejos catión-anión en la superficie de oxihidróxidos de Fe y Al. El Pb ha sido inmovilizado frecuentemente con la adición de enmiendas de fósforo para promover su precipitación en forma de piromorfita (Kumpiene et al., 2008). El aporte de fósforo ha sido tradicionalmente empleado para reducir la cantidad de As en los tejidos vegetales (por ej. en arroz en Talukder et al., 2012).

La adición de sales de hierro, como sulfato de hierro(II), acidifica el medio mediante la liberación de protones al formarse hidróxido de Fe (III). Una forma de añadir Fe al suelo, sin que conlleve una bajada brusca del pH, es como escorias de hierro. Son un producto de la manufactura del acero, con un alto contenido en Fe y en Ca y con un pH alcalino. Estas han sido usadas para disminuir la extractabilidad del As en suelo (Gutiérrez et al., 2010). La incorporación de fuentes de hierro, junto con materiales alcalinos para aliviar la bajada de pH que supone la liberación de protones al añadir sulfato ferroso, es una práctica habitual. Este hecho determina que la adición única de oxi-hidróxidos de hierro en determinadas dosis no sea recomendable

puesto que la disminución de pH por debajo de ciertos valores induce la liberación de elementos tóxicos para las plantas, como el aluminio, impidiendo el crecimiento vegetal e induciendo el empobrecimiento de la actividad microbiana del suelo. Hartley y Lepp (2008) observaron que la adición de sulfato de hierro (II) y (III) junto con una enmienda alcalina contribuía al aumento de la concentración de arsénico en la fracción ligada a los óxidos de hierro y aluminio. Este incremento fue atribuido principalmente al aumento de pH. Sin embargo, al mismo tiempo que la lixiviación de arsénico disminuye, un cambio de pH del suelo puede conllevar la liberación de metales. Por ello es habitual el aporte de materiales que ayuden a subir el pH del suelo, como los que contienen óxidos de calcio y/o carbonato de calcio, etc. Los lodos de residuo de papelera han sido extensamente utilizados en las últimas décadas como potenciadores de la producción agrícola y como enmienda en suelos degradados y contaminados. Estos lodos albergan un alto contenido en óxidos de calcio, por lo que pueden considerarse un material encalante. La utilización de lodos de residuo de papelera en el suelo debe ir acompañada de aportes adicionales de nutrientes para las plantas, dado el alto contenido de carbono y el bajo de nitrógeno (Park et al., 2011). Se pueden encontrar algunos casos de aplicación de residuo de papelera en las décadas pasadas como ejemplo de la repercusión positiva que ha tenido hasta la actualidad: Ritter et al., 1992; Beyer et al., 1992; Camberato et al., 1997; Trepanier et al., 1998, y otros más recientes como en Barriga et al., 2010; Calace et al., 2005. Siguiendo con los materiales encalantes, los lodos de la remolacha azucarera, subproducto industrial de la obtención del azúcar también poseen un carácter alcalino, con una concentración entre el 70 y el 80% de CaCO_3 , y han sido aportados a suelos mineros con resultados satisfactorios en cuanto a retención de metales en el suelo (Alvarenga et al., 2008b; Domínguez et al., 2009). Otro material que goza de gran futuro en el campo de la remediación, sobre todo en las regiones mediterráneas donde la industria de la extracción de aceite de oliva es de gran importancia, es el compost del alperujo, que es un subproducto de la industria del procesado del aceite de oliva. Es un material sólido, con un alto contenido de lignocelulosa y de carácter alcalino (Alburquerque et al., 2011). Solo en España la producción de alperujo es de 4 toneladas métricas (Martínez-Fernández y Walker, 2011). Este material, dado su alto contenido en polifenoles potencialmente tóxicos, debe recibir un pretratamiento, como el compostaje, antes de su aplicación a los suelos. Los resultados basados en la utilización del compost de alperujo muestran cómo el efecto encalante reduce la movilidad de metales y además mejora la fertilidad de los suelos gracias al aporte de C, N y P (Alburquerque et al., 2011). Además, el contenido de materia orgánica es más estable, en comparación con otros residuos orgánicos como el estiércol de cerdo (Pardo et al., 2011). Otros materiales apropiados para su

incorporación en el suelo son los subproductos de la industria del champiñón, como el sustrato y el micelio del hongo que queda cuando se recoge el champiñón. Es una industria en continuo crecimiento, por lo que la generación de residuos aumenta año tras año. También se ha planteado la obtención de otros productos de valor añadido de este sustrato, como enzimas lignocelulósicas, como lacasa, lignina peroxidasa, celulasa y hemicelulasa (Phan y Sabaratnam, 2012).

Estos últimos materiales descritos, además de favorecer la subida del pH del suelo, también aportan materia orgánica. Este aporte es fundamental en suelos en ambientes degradados, como los localizados en zonas mineras, donde la concentración de materia orgánica suele ser muy baja y los nutrientes para las plantas y microorganismos escasos. Además, la materia orgánica ayuda al establecimiento de plantas, contribuye a mejorar las propiedades físicas del suelo, como la textura, la capacidad de retención de agua y la estabilización de agregados (de especial importancia en ambientes mineros donde la textura es arenosa). Las sustancias húmicas tienen capacidad de adsorción de solutos de la solución del suelo y una gran afinidad por cationes metálicos (Manahan, 2010). No obstante, se han observado efectos contradictorios en la interacción entre compost y metales y metaloides, sobre todo en el caso del arsénico (Kumpiene et al., 2008; Hartley et al., 2009a). En la literatura es posible encontrar referencias que apuntan a la disminución de la lixiviación de arsénico en el suelo al añadir compost procedente de residuos vegetales (Tandy et al., 2009), y otros en los que aumenta su movilización (Mench et al., 2003; Hartley et al., 2009a, 2009b;). Los compuestos orgánicos solubles de la materia orgánica o el fósforo soluble del propio compost pueden desplazar de las posiciones de intercambio al arsénico, potenciando la movilidad del mismo (Wang y Mulligan, 2006b, 2009). Es por ello que se requiere cuidado y previsión a la hora de trabajar con estos materiales.

El reciclaje de materiales con un alto contenido de materia orgánica puede constituir una fuente de carbono importante para suelos degradados (Dickinson y Pulford, 2005). Estos suelos podrían almacenar carbono de manera eficiente puesto que tienen una falta del mismo y están lejos de alcanzar el nivel de saturación de carbono (Stewart et al., 2008). El aporte de enmiendas orgánicas como el compost de residuos vegetales aumenta el carbono orgánico en suelos (Leroy et al., 2008). Sin embargo existen referencias en las que no existe correlación entre el carbono aportado al suelo y el almacenado (Fontaine et al., 2007). De todo el carbono aportado al suelo el carbono orgánico disuelto (COD) es la fracción de materia orgánica potencialmente biodisponible en suelos. Buckingham et al. (2008) lo describieron como la fracción de materia orgánica que puede pasar a través de un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro. Sin embargo, la

pérdida de COD hacia horizontes inferiores del suelo es una de las vías por las que los suelos pierden carbono más fácilmente. Representa una fracción pequeña pero importante (Neff y Asner, 2001), y debido a su rápida movilización a largo plazo puede ser necesario el aporte adicional de materia orgánica para mantener unos niveles apropiados de carbono orgánico. En cuanto a la capacidad de retención/movilización de metales, es conocida y está documentada la relación de la movilización de Cu con la del COD (Beesley y Dickinson, 2010). El compost agotado del cultivo del champiñón también ha sido usado para la mejora del crecimiento de cultivos y la reducción de la fitotoxicidad producida por el arsénico (Koo et al., 2011), utilizándose como sorbente de metales como el Cd, Cr y Pb (Chen et al., 2005).

Además del compost, recientemente el uso de “biochar” ha recibido una especial atención al contener una gran cantidad de carbono orgánico (Yin Chan y Xu, 2009). Aunque la principal aplicación del biochar ha sido el secuestro de carbono, presenta un gran potencial para alterar de manera significativa la solubilidad, movilidad, transporte y distribución espacial de metales (Park et al., 2011). Las referencias en la bibliografía sobre la aplicación de este material para la remediación de suelos contaminados con metales son numerosas y han aumentando en los últimos años (Hartley et al., 2009b; Beesley et al., 2010a, 2010b; Karami et al., 2011). Beesley y Marmiroli (2011) definieron el biochar como un material de baja densidad que se obtiene por la combustión de biomasa a baja temperatura y con una mínima concentración de oxígeno. Durante el proceso de carbonización del biochar, el área superficial del material puede aumentar varios miles de veces (Thies y Rillig, 2009). Gracias a esta característica, el aporte de biochar puede mejorar las propiedades físico-químicas del suelo, favorecer la adsorción de nutrientes, especialmente Ca, P, Zn y Mn (Novak et al., 2009; Laird et al., 2010), incrementar la porosidad del suelo y aumentar la capacidad de retención de agua. En cuanto a la relación entre la solubilidad de elementos traza y el aporte de biochar al suelo también existen resultados diferentes, sobre todo en cuanto a arsénico y metales se refiere. Mientras que Hartley et al., (2009b) observaron que el aporte de biochar a suelos multi-contaminados incrementó la fracción soluble de Fe y el carbono en la disolución del suelo, lo cual contribuyó al aumento de la concentración de arsénico en la fase soluble del suelo, Park et al. (2011) encontraron una reducción de la concentración de Cd y Pb en el agua intersticial del suelo, al igual que Beesley y Marmiroli (2011) con la concentración soluble en agua de Cd y Zn. La combinación de biochar con otras enmiendas orgánicas también ha sido estudiada, indicando que la aplicación favorece en conjunto la reducción de elementos tóxicos en la solución del suelo y la absorción por la planta, como por ejemplo el Pb (Karami et al., 2011). Sin duda se trata de un material bastante versátil. Es recomendable analizar a largo plazo hasta qué punto se puede alterar la capacidad

de retención del biochar con el tiempo, puesto que las posiciones de intercambio pueden ser ocupadas y saturadas por otros componentes originarios del suelo, como la materia orgánica. Además, al igual que con todas las enmiendas, pero más especialmente debido a la baja densidad del biochar, debemos asegurar que los efectos observados no se deban al efecto de dilución del sustrato contaminado (Beesley et al., 2011).

El estudio de las nanopartículas en el campo de la remediación de metales ha dado un gran salto desde el año 2009, sobre todo en la eliminación de contaminantes del agua. Las nanopartículas están presentes de manera natural en el medio y pueden originarse de forma biótica o abiótica por procesos de meteorización o precipitación. En general son sólidos cuyo tamaño es inferior a 100 nm, siendo las que llevan hierro las formas minerales naturales más comunes (He et al., 2007). El secuestro de contaminantes sucede mediante la complejación en superficie y mediante la formación de agregados que encapsulan especies adsorbidas en la superficie. Sin embargo la asociación de estas partículas en agregados de micro a milímetros conlleva perder una de sus características más ventajosas que es la elevada área superficial específica. Por ello suelen añadirse polímeros orgánicos para controlar la aglomeración y tamaño de partículas (An y Zhao et al., 2012). Algunos estudios muestran una elevada capacidad de retención de As sobre nanopartículas de Fe, como por ejemplo de magnetita y hematita (Shipley et al., 2010) y también Cr, Pb, Hg y Se (Waychunas et al., 2005; Xu y Zhao, 2007). Las nanopartículas de óxidos de titanio son unos de los óxidos producidos en la industria de forma más extensiva para la fabricación de cubiertas, pinturas, pigmentos, paneles solares, etc. Son una fuente de contaminación de medios acuáticos (Chen et al., 2012). Sin embargo, cada vez se está estudiando más su uso en la adsorción de elementos contaminantes en el ámbito de la remediación de aguas continentales (Bang et al., 2005; Han 2012; Tang et al., 2012). Sin duda, la regulación del aprovechamiento de estos materiales y de las implicaciones ecológicas que deriven de su uso deben ser estudiados con atención.

CAPÍTULO I.6

EVALUACIÓN DEL PROCESO REMEDIADOR. ECOTOXICOLOGÍA

La “salud de un suelo” ha sido definida como la capacidad del mismo para funcionar como un sistema vivo en el ecosistema, mantener o mejorar la calidad del agua y del aire y estimular la salud de la flora y la fauna (Doran y Zeiss, 2000).

A partir de los años 90 se comenzó a tener un mayor conocimiento sobre la importancia de la recuperación de las funciones de un suelo tras una alteración de sus propiedades iniciales. En el caso que nos concierne, después de haber efectuado un proceso remediador con el objetivo de recuperar aquellas funciones biológicas que el suelo poseía previamente a la modificación de las mismas, es necesario evaluar el éxito y la sostenibilidad del proceso que conduce a esa recuperación. El uso de organismos ha sido de gran utilidad para valorar el proceso remediador. Los análisis químicos no proporcionan una estimación de las consecuencias toxicológicas sobre la biota (Fent, 2004), debido a que no reflejan el efecto tóxico de los contaminantes sobre los organismos (ISO/DIS 17402, 2006) y no integran el efecto combinado de la mezcla de todos los contaminantes (Saterbak et al., 1999). Estos no deben ser evaluados individualmente, ya que cada uno de manera aislada difícilmente puede explicar los efectos que la matriz en conjunto puede producir sobre los seres vivos (Hinojosa et al., 2008). Los ensayos químicos pueden proporcionar datos sobre la movilidad y la disponibilidad de determinados elementos en el suelo, pero son insuficientes para ayudar a estimar la repercusión sobre la salud de los organismos presentes en un suelo. Es por ello, que se recomienda evaluar los efectos producidos por la introducción de cualquier cambio en el suelo mediante parámetros químicos y biológicos.

Requerimientos y limitaciones

Los ensayos más comunes llevados a cabo con organismos son de dos tipos: agudos y crónicos. La mayoría de los datos ecotoxicológicos que se encuentran en la literatura corresponden a ensayos agudos, principalmente con lombrices de tierra, plantas, crustáceos, algas, rotíferos y microorganismos (Dorn et al., 1998). Es necesario tener en cuenta los requisitos necesarios para que la información obtenida permita interpretar los resultados en muestras

reales. En primer lugar, es preciso realizar una batería de bioensayos combinando diferentes organismos que permita comparar, descartar o corroborar los resultados obtenidos; elegir organismos representativos del ecosistema que se está monitorizando (Van Gestel et al., 2001; Leitgib et al., 2007) y además deben ser taxonómicamente diferentes. Deben jugar diferentes papeles en el ecosistema y deben poder ser expuestos al tóxico mediante diferentes vías de exposición. La tolerancia y el comportamiento de los organismos frente a posibles cambios de las propiedades físico-químicas del medio de exposición es de importancia (Van Gestel et al., 2001), puesto que en los ensayos ecotoxicológicos los organismos podrán estar expuestos a suelos artificiales o entrar en contacto con lixiviados de suelo obtenidos mediante extracción química. Por supuesto, la disponibilidad de los organismos en el momento de realizar los ensayos debe tenerse en cuenta, así como la condición de ser asequibles en términos económicos y de tiempo.

En numerosas ocasiones, se realizan bioensayos en extracciones de suelo con organismos que habitan en medios acuosos, como los ensayos de inmovilización de *Daphnia magna* y de la reducción de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*. El principio en el que se funda este procedimiento se basa en que los compuestos químicos (contaminantes) presentes en la fase acuosa pueden repercutir sobre estos organismos. *Daphnia* y *Vibrio* se utilizan para estudiar toxicidad en aguas, pero los métodos han sido adaptados para evaluar el impacto de la composición del suelo sobre el agua superficial (Van Gestel et al., 2001; Loureiro et al., 2005). En estos casos, cuando se utilizan organismos acuáticos en lugar de terrestres, se debe elegir un método de extracción de la fracción soluble del suelo. Esta fracción debe representar de forma realista la biodisponibilidad de los elementos químicos del suelo, puesto que los efectos ecotoxicológicos dependen de la fracción disponible de los contaminantes. Igualmente, los extractantes no deben ser perjudiciales para los organismos expuestos, porque de lo contrario no podríamos discriminar cuál es la fuente nociva para ellos. Se ha ensayado con sales neutras, agua, ácidos, etc. en determinadas proporciones y diferentes formas y tiempos de extracción, como por ejemplo centrifugación, agitación, extracción al vacío con rizosondas etc. Es sustancial definir los principios de extracción previamente, dado que la composición química de la fase acuosa del suelo resultante puede ser diferente dependiendo del método de extracción y por tanto afectar a la respuesta de los organismos (Tiensing et al., 2001). En esta Tesis, el método utilizado para los ensayos con organismos acuáticos ha sido la extracción con agua ultrapura en una proporción suelo:agua 1:10 (p/v) mediante agitación por volteo durante 24h a temperatura ambiente, método establecido por las normas de estandarización DIN (DIN 38 414-S4, 1984).

El factor económico y en el factor tiempo son otras dos limitaciones. Obviamente, la puesta en marcha de ensayos crónicos, tales como los ensayos crónicos de reproducción de *D. magna*, encarece y alarga el proceso. Sin embargo, en comparación con los ensayos agudos, son más representativos desde el punto de vista ecológico. Además, la sensibilidad hacia el tóxico puede ser diferente a la sensibilidad desarrollada en el ensayo agudo cuando se trabaja con el mismo ser vivo, probablemente debido a que el nivel de contaminación y el tiempo de exposición no son suficientes para desencadenar efectos agudos. Los ensayos agudos pueden ser bastante útiles para realizar una detección primaria de la contaminación de suelos con alto niveles de elementos traza y fijar si el nivel de contaminación es suficiente como para producir toxicidad a corto plazo, pero para una monitorización a largo plazo, sería necesaria la detección de efectos crónicos (Van Gestel et al., 2001).

La extrapolación a condiciones de campo no siempre es fácil, puesto que puede tener lugar una adaptación de los organismos a los contaminantes. Además, las especies que se usan en el laboratorio pueden no coincidir con las reales, por ello deben elegirse organismos representativos del ecosistema a estudiar. La fiabilidad de los resultados será mayor cuando se use una variedad de diferentes ensayos, con organismos de diferentes niveles taxonómicos y funciones biológicas como se ha comentado anteriormente, para poder predecir correctamente la respuesta. La extrapolación es complicada, pero es una parte esencial de la evaluación de riesgos ambientales.

Ensayos ecotoxicológicos más comunes

La determinación de las actividades enzimáticas antes y después de un proceso remediador es un buen indicador de la calidad de un suelo y de su degradación (Perez de Mora et al., 2006b). De esta observación deriva la recomendación de utilizar el análisis de las actividades enzimáticas para evaluar posibles riesgos asociados a la presencia de elementos traza (Hinojosa et al., 2004, 2008), los cuales suelen afectar de manera negativa a la diversidad y actividad microbiana del suelo y por lo tanto, podría verse reflejado en el nivel de las actividades enzimáticas de los suelos (Kandeler y Gerber, 1988; Chander et al., 2001, Renella et al., 2008). Existen otros parámetros que también son valiosos para la monitorización de las funciones biológicas de la actividad microbiana, como la respiración del suelo, la masa microbiana, la mineralización del nitrógeno etc. (Visser y Parkinson, 1992). Los análisis de ADN permiten determinar la población microbiológica de forma muy precisa, proporcionando información sobre la riqueza y composición de la comunidad microbiana (Renella et al., 2008). No solo la presencia de metales pesados en el suelo, sino cualquier modificación del manejo del mismo

puede suscitar un cambio rápido de la actividad enzimática del suelo (Madejón et al., 2009). Por ejemplo, la medida de algunas actividades enzimáticas proporciona información sobre prácticas agronómicas inadecuadas, que provocan la reducción de ciertas actividades microbianas. Por tanto, es de esperar que el aporte de enmendantes al suelo produzca cambios en la comunidad microbiana.

Desde los años 70, en los que se realizaron los primeros ensayos con microorganismos, en concreto con *V. fischeri*, los bioensayos para determinar toxicidad en organismos han sido cada vez más habituales. Se han diseñado tipo de protocolos, y hoy en día podemos encontrar una gran variedad de normas estandarizadas con organismos pertenecientes a numerosos niveles taxonómicos. Se ha demostrado que las bacterias *V. fischeri* son organismos sensibles a la exposición a metales pesados y pueden desarrollar efectos tóxicos tanto agudos como crónicos causados por un amplio rango de compuestos químicos, no solo metales pesados (Ribo y Kaiser, 1983). Los ensayos con *V. fischeri* permiten determinar la reducción de la luminiscencia emitida por estas bacterias cuando se exponen a una fuente de contaminación. La intensidad de la luminiscencia determina el estado metabólico de la bacteria (Wolska et al., 2007), de manera que la producción de luz es directamente proporcional a la actividad metabólica del conjunto de las bacterias (Parvez et al., 2006). Es un test usado ampliamente debido a la simplicidad del mismo y a la rapidez de su respuesta (Tsiridis et al., 2006), puesto que con 15 y 30 minutos de exposición al tóxico es posible obtener unos primeros resultados. Se ha demostrado que los ensayos con *V. fischeri* son unos de los más sensibles a una amplia variedad de contaminantes en comparación con otros ensayos con bacterias y a otros distintos como la inhibición de la nitrificación o la inhibición enzimática. Algunos, además, sostienen que los resultados son extrapolables a organismos superiores (Parvez et al., 2006).

Los bioensayos más frecuentes con *D. magna* son dos, inmovilización (agudo) y reproducción (crónico). La principal ventaja que poseen estos organismos invertebrados para ser utilizados en un ensayo toxicológico es que pueden ser generados fácilmente en un periodo corto de tiempo en el laboratorio, en la validez que han demostrado tener para evaluar la toxicidad de elementos traza, y en su sensibilidad a un amplio rango de contaminantes (Bostan et al., 2005; Barata et al., 2007, Miranda et al., 2010). Al igual que *V. fischeri*, estos organismos se han usado habitualmente para la evaluación de la calidad del agua, como ya se ha mencionado anteriormente (Antunes et al., 2007; Palma et al., 2010), pero los protocolos se han adaptado para poder exponer estos organismos a lixiviados procedentes de suelos y evaluar la fracción disponible de contaminantes (Kungolos et al., 2004; Renoux et al., 2001). El ensayo de inmovilización es un ensayo de mortalidad que consiste en el recuento de los organismos que

sobreviven después de 48 h de exposición al tóxico. En este caso, los organismos están en contacto con lixiviados de los suelos contaminados que contienen elementos tóxicos. Los ensayos de reproducción evalúan el efecto de los compuestos químicos sobre la reproducción de organismos hembra de *D. magna* tras 21 días de exposición. Al final del ensayo se tienen en cuenta sólo los organismos juveniles que quedan vivos producidos por cada organismo adulto vivo. El objetivo es poder calcular concentraciones de elemento tóxico LOEC y NOEC, esto es, la concentración más baja del elemento o compuesto químico que produce efectos tóxicos y la concentración más alta que no produce ninguno.

Los ensayos de evitación con *E. fetida* son útiles para evaluar cambios en la función “hábitat del suelo” y la influencia de los contaminantes sobre el comportamiento de las lombrices. Un suelo presenta una función hábitat limitada si más del 80% de los organismos se encuentran en el suelo control (libre de contaminación) (ISO/DIS 17512-1, 2008). Si esto es así, se sugiere que ha habido un impacto en el comportamiento de las lombrices. La razón por la que se usan estos organismos es que pueden ser reproducidos fácil y rápidamente en el laboratorio, al igual que *D. magna*, y que la sensibilidad que muestran hacia los contaminantes es del mismo orden que la que pueden presentar otras especies de lombrices de tierra. La evitación es un parámetro incluso más sensible que otras medidas que se evalúan en ensayos crónicos, como la reproducción o el crecimiento (Loureiro et al., 2005).

Además de estos tres ensayos descritos, existen otros muchos que podemos encontrar de manera frecuente en la bibliografía y que se basan en los mismos principios que los anteriores: crecimiento, mortalidad, cambio de comportamiento, etc. Entre los más habituales, y para los cuales se comercializan kits para la detección y la cuantificación de la toxicidad de productos químicos en diferentes matrices (por ej. MicroBioTests Inc.), se encuentran tests con rotíferos, bacterias, algas y crustáceos. En la bibliografía encontramos bioensayos de mortalidad con el crustáceo *Thamnocephalus platyurus* (Palma et al., 2008, 2010 en aguas), conforme al protocolo de MicroBioTests IncR (Personne, 1999); *Artemia franciscana* (Hadjispyrou, 2001); inhibición de la reproducción del crustáceo *Ceriodaphnia dubia* (Pandard et al., 2006); mortalidad y crecimiento del crustáceo *Heterocypris incongruens* en ensayos de contacto directo con sedimentos (Kudlak et al., 2011). También se encuentran en la bibliografía ensayos de toxicidad de inhibición del crecimiento en algas. Algunos ejemplos son *Pseudokirchneriella subcapitata*, conforme a la norma ISO/DIS 8692 (2002); *Selenastrum capricornutum* (Van Gestel et al., 2001) y *Phaeodactylum tricornutum* (Zhuravel, et al, 2012).

Recientemente, los ensayos de embriotoxicidad con óvulos de *D. magna* han suscitado gran atención ante la posibilidad de convertirse en una alternativa a otros ensayos de mayor

duración. Sin embargo, de momento sólo se han realizado contados ensayos (por ej. Palma et al., 2009, Sobral et al., 2001). La principal ventaja es que son menos costosos y más rápidos que los ensayos clásicos de mortalidad de *Daphnia*. Además, se ha demostrado que los embriones tienen una sensibilidad mayor a determinados tóxicos en comparación con otros estadios de *D. magna* (Baird et al., 1991). Como los ovocitos se desarrollan en la bolsa embrionaria con independencia de los organismos madre, se pueden extraer, permitiendo la continuación de su desarrollo embrionario en cultivos *in vitro*, en los que se les somete a exposición directa con el tóxico (Sobral et al., 2001). El objetivo es determinar el porcentaje de anomalías observadas en cada una de las fases del desarrollo embrionario (anormalidades en el tamaño, falta de desarrollo de los ovocitos, etc.). Estos ensayos pueden ser una alternativa a los ensayos de reproducción, que precisan de al menos 21 días (Palma et al., 2010), en comparación con los embrionarios que pueden tener una duración de 12 horas (Sobral et al., 2001).

Todo ello pone de manifiesto que el campo de investigación en toxicología es bastante amplio, y desde que se iniciaron los primeros ensayos con *Vibrio*, la investigación no deja de avanzar buscando nuevos protocolos que abaraten el proceso, reduzcan tiempo y mejoren la sensibilidad y la reproducibilidad de los ensayos. La elección de los parámetros ecotoxicológicos debe nacer de un equilibrio entre el esfuerzo para realizar el test, el tiempo y el coste requerido y la sensibilidad a los compuestos químicos de la matriz tóxica.

Sensibilidad de los organismos y correlaciones entre ensayos

Se ha estudiado el efecto del aporte de enmiendas sobre las actividades enzimáticas del suelo, demostrando que la sensibilidad de las mismas depende del material que se añada. Por lo general, el aporte de un material que conlleve una subida de pH tiene efectos beneficiosos sobre la comunidad microbiana, aunque es el aporte de materiales orgánicos el factor que más favorece al aumento de las actividades enzimáticas (Alvarenga et al., 2012). La actividad de las enzimas relacionadas con los ciclos de nutrientes de C y N, como β -glucosidasa, celulasa, ureasa y proteasa, proporcionarían más información sobre cambios en la salud del suelo cuando se aporta materia orgánica, puesto que participan en la degradación de la misma (Alvarenga et al., 2009, 2012). Junto con las anteriores, la fosfatasa ácida, que es la enzima responsable de la mineralización del fósforo orgánico en suelos ácidos, se considera un buen índice de la calidad y cantidad de materia orgánica en el suelos (Gil-Sotres et al., 2005), por lo que también puede facilitar datos sobre variaciones en la salud del suelo enmendados con compuestos orgánicos.

Es destacable mencionar que en la bibliografía se pueden encontrar resultados contradictorios, como aumento o reducción de la misma actividad enzimática bajo las mismas

condiciones ambientales o cambios no esperados. La incorporación de materiales encalantes es beneficiosa para la actividad de los microorganismos en el suelo, como la actividad deshidrogenasa (Alvarenga et al., 2008b), mientras que en otros casos no se observan diferencias entre suelos enmendados y no enmendados (Hinojosa et al., 2004). En ensayos donde se incorporaron materiales inorgánicos como hierro metálico y beringita, se observó que a pesar del aumento del contenido total de N, la actividad ureasa disminuía con respecto al control (Ascher et al., 2009), lo cual se puede explicar por el aumento del arsénico lábil cuyo efecto tóxico no pudo ser contrarrestado por la mejora de otras propiedades del suelo. Sastre-Conde et al. (2007) apuntaron que la aplicación de lodos residuales en suelos contaminados con metales pesados aumentó la actividad de enzimas como la fosfatasa y la β -glucosidasa; sin embargo, los cambios producidos en la actividad ureasa no proporcionaron evidencias de la recuperación de los suelos como las anteriores.

La presencia de plantas en los suelos contaminados crea un ambiente favorable para el incremento de las actividades enzimáticas del suelo, puesto que aportan materia orgánica al suelo y pueden modificar el pH. Sin embargo, no siempre se traduce en un aumento de la actividad microbiana (Alvarenga et al., 2009). De hecho, en este último trabajo sólo se encontró una correlación significativa entre crecimiento de las plantas y actividad ureasa. En el análisis de otros parámetros a nivel celular, como el de ADN del suelo, no siempre existe una correlación significativamente robusta entre riqueza microbiana y restauración de la calidad de un suelo (Renella et al., 2008).

Muchos de los esfuerzos se han centrado en determinar cuáles son los organismos más adecuados para la evaluación de la salud del suelo mediante la comparación entre bioensayos con organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos, con ensayos de toxicidad aguda y crónica, en suelos y con residuos de diferentes características físico-químicas, para seleccionar entre todo un conjunto de bioensayos los que muestren una mayor sensibilidad a los efectos tóxicos causados por la contaminación. De esta manera se ha conseguido hacer una selección con carácter general de organismos que pueden aportar información. Es el caso de *V. fischeri*, que se aplica tanto en agua, como en lixiviados de suelos (Fuentes et al., 2006) y ha conseguido convertirse en uno de los test más aceptados globalmente. En la bibliografía existen numerosas referencias, mostrando la sensibilidad de *V. fischeri* tanto a compuestos orgánicos como a metales pesados. *Vibrio fischeri* muestra una buena correlación entre su EC_{50} y la LC_{50} de otros organismos acuáticos superiores, entre los que está incluida *D. magna* (Kaiser et al., 1998). También muestra la misma o mayor sensibilidad que determinadas especies de algas. El mantenimiento de estas últimas requiere tiempo y el proceso es costoso, por lo que ante esta

dificultad muchos autores prefieren los bioensayos de luminiscencia (Padrtova et al., 1998). Frente a otros parámetros a nivel celular, como la inhibición de la nitrificación, la respirometría y la inhibición enzimática, el ensayo de inhibición de luminiscencia también parece más sensible y viable, incluidas las comparaciones en cuanto a coste por test y facilidad de uso (Dalzell, 2002). Alvarenga et al. (2007) observaron que *V. fischeri* fue más sensible que *D. magna* y *E. fétida* en ensayos con aplicación de enmendantes orgánicos en suelos contaminados con metales. En este trabajo, tanto *D. magna* como el ensayo de mortalidad de *E. fétida* solo mostraron toxicidad hacia uno de los tratamientos, atribuyendo el efecto sobre *E. fétida* a la alta salinidad del enmendante. Otros trabajos de los mismos autores (Alvarenga et al., 2008a, 2009) también muestran la alta sensibilidad de *V. fischeri* frente a los ensayos de mortalidad de *E. fétida* y ensayos de germinación, aunque, *D. magna* mostró una mayor sensibilidad que *V. fischeri*. En la bibliografía se encuentra como el ensayo de inmovilización de *D. magna* es uno de los menos sensibles a la contaminación en ensayos en los que al mismo tiempo se evalúa la sensibilidad de otros como, los mencionados con *V. fischeri*, *E. fétida*, plantas, crecimiento de algas (Fernández et al., 2005). Los ensayos de crecimiento de plantas también destacan por su sensibilidad a los tóxicos (por ej, *Lepidium sativum* L. en Chaîneau et al., 2003; *Lactuca sativa* en Paudard et al., 2006; *Avena sativa* en Natal Da luz et al., 2009). En cambio otros autores no han observado efectos tóxicos sobre las plantas en suelos con altos contenidos de metales, como por ej. Leitgib et al. (2007) en la elongación de la raíz o el tallo de *Sinapis alba*. Los test de germinación son también frecuentes en la bibliografía. Fuentes et al. (2006) observaron que los ensayos de germinación de semillas de cebada, y los de berro mostraron una sensibilidad igual o mayor que el ensayo de bioluminiscencia.

En contraste con todos estos ejemplos, también hay estudios que determinan que los ensayos crónicos ofrecen una información más sensible que los agudos (Loureiro et al., 2005). Van Gestel et al. (2001) determinaron, tras realizar ensayos de mortalidad con lombrices de tierra, que la sensibilidad hacia los compuestos tóxicos presentes en muestras de suelos procedentes de una refinería era mayor que en los ensayos agudos de *D. magna* y *V. fischeri*.

Estudiando todos los datos a nuestra disposición, es relevante que los ensayos basados en la inhibición de la bioluminiscencia es uno de los mas frecuentemente usados, teniendo en cuenta el factor tiempo, coste, sensibilidad hacia los tóxicos y reproducibilidad. Se podría decir que es un ensayo fundamental que no puede faltar a la hora de evaluar el éxito de los procesos de remediación. Es una herramienta bastante versátil que permite conseguir resultados de forma rápida y que según los resultados observados por numerosos autores, posee una sensibilidad igual o mayor que la de otros organismos superiores, de forma que los resultados

pueden ser extrapolables. Generalmente la actividad enzimática deshidrogenasa y las de las hidrolasas como fosfatasa, ureasa y β -glucosidasa reflejan la actividad microbiana y representan un amplio número de procesos relacionados con la descomposición y el ciclo de nutrientes (Alvarenga et al., 2008a, 2008b). Sobre todo, la actividad deshidrogenasa, puesto que intervienen enzimas oxidoreductoras que ofrecen una medida directa de la población microbiana. Sólo están presentes en células vivas, por lo que los resultados representan la actividad media de la población microbiana activa (Izquierdo et al., 2005).

Muchos de estos bioensayos no son de contacto directo entre organismo y suelo, sino que, como se ha comentado anteriormente, los protocolos se han adaptado para poder usar lixiviados de suelos contaminados en lugar de la propia matriz sólida. Cabe pensar que sería mucho más objetivo realizar ensayos de contacto directo, como a los que se someten lombrices de tierra. Así, como apuntan ciertos autores, los test de exposición directa proporcionan los mejores resultados (índices de germinación, crecimiento de plantas, ensayos comportamentales, mortalidad de lombrices de tierra en Renoux et al., 2001 y Leitgib et al., 2007).

Los resultados que se obtienen con los ensayos biológicos tienen una dependencia muy acusada a la sensibilidad del organismo usado hacia el tóxico o el conjunto de los mismos. Los efectos tóxicos sobre el organismo dependen de la durabilidad e intensidad de la exposición. Todo ello pone de manifiesto que la respuesta biológica hacia los tóxicos es enormemente variable: pueden existir grupos de organismos que no se vean afectados, otros que reaccionan a un conjunto específico de tóxicos y otros cuya respuesta tóxica está relacionada con la exposición a algún elemento contaminante en particular o con el sinergismo existente entre pares de elementos (Alvarenga et al., 2007). Una disminución de la toxicidad de un suelo puede no ir acompañada de un aumento de la riqueza microbiana por ejemplo. Es fundamental continuar la investigación para determinar si es necesario un periodo de tiempo más prolongado para el establecimiento de la comunidad microbiana y de las interacciones suelo-microorganismos, para entender mejor cuáles son los principales mecanismos que conducen a la colonización microbiana propia de suelos remediados.

Por todo ello, no es suficiente un único bioensayo para monitorizar un proceso de remediación. Es necesario, de entre los numerosos test que se pueden realizar, seleccionar los más acordes según las características de la matriz que deseamos monitorizar, según los materiales que se adicionan al suelo y por supuesto, contar con las limitaciones de los organismos para evaluar correctamente la respuesta tóxica y para revelar diferentes respuestas (Kapanen et al., 2001).

CAPÍTULO I.7

TRABAJOS PREVIOS EN LA MINA MÓNICA DE BUSTARVIEJO (COMUNIDAD DE MADRID)

Esta Tesis sirve como base para la implementación de una tecnología de remediación en la mina de arsenopirita llamada “Mónica”, localizada en el término municipal de Bustarviejo, Comunidad de Madrid.

Han sido publicados previamente varios trabajos en relación a la distribución de arsénico y metales pesados en la mina Mónica. Estos trabajos también incluyen la determinación de arsénico y metales pesados en plantas recogidas a lo largo de toda la zona de estudio. Para más información se puede consultar Moreno-Jiménez et al., 2009 y 2010a.

Los principales minerales presentes en la mina Mónica son la arsenopirita y la matildita. La arsenopirita es un mineral muy abundante en la zona de escombreras. Se encuentra en superficie en la parte más elevada de la mina donde aparece en pequeñas bolsadas de cuarzo brechificado; en el interior de la mina se encuentra en forma de grandes masas decimétricas y en pequeñas cantidades en el camino. Puede contener hasta un 0,4% de plata en forma de matildita (sulfuro de bismuto y plata).

La explotación de la mina tuvo lugar prácticamente de forma ininterrumpida desde el siglo XVII hasta la década de los 80. En la actualidad la zona está en proceso de recuperación por parte del Ayuntamiento de Bustarviejo y de la Comunidad de Madrid. El proyecto incluye la creación de un museo en el interior de la mina, la limpieza de los caminos que acceden a la boca de la mina, y la instalación de paneles explicativos y mesas en la zona más próxima a la entrada. Además, todavía se pueden ver restos de hornos de calcinación, maquinaria de trituración del siglo XX y la torre del molino, elementos que el Ayuntamiento de Bustarviejo desea mantener para su exhibición al público. En la zona más alta se encuentran los conductos de humos y ruinas de la chimenea, las escombreras de los pozos, el torno superior y se observan afloramientos de la mineralización (Jiménez et al., 2004). La zona en concreto, está dedicada al pastoreo de vacas y caballos.

Aunque existen numerosos datos sobre suelos mineros de España, los trabajos sobre las minas de la Comunidad de Madrid son escasos, a pesar de la existencia de gran cantidad de

explotaciones mineras en desuso, sobre todo de cobre y otros de plata, plomo y estaño (Jordá 2003; Jordá et al., 2005). Los trabajos de Moreno-Jiménez et al. (2009, 2010a) abren la puerta al estudio de la recuperación de los suelos contaminados de los emplazamientos mineros de la mina Mónica.

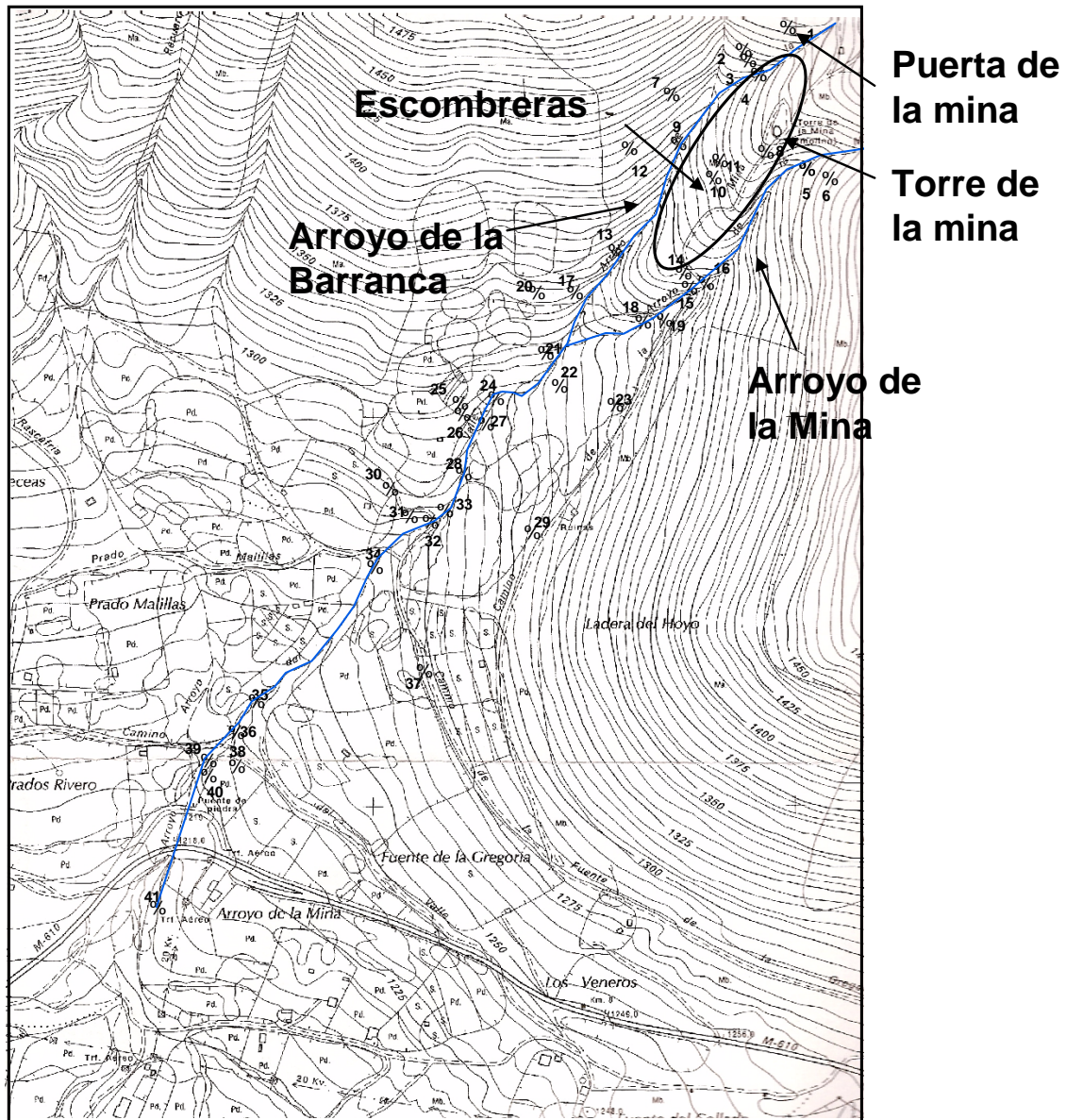


Figura 5. Puntos de importancia en la zona minera.

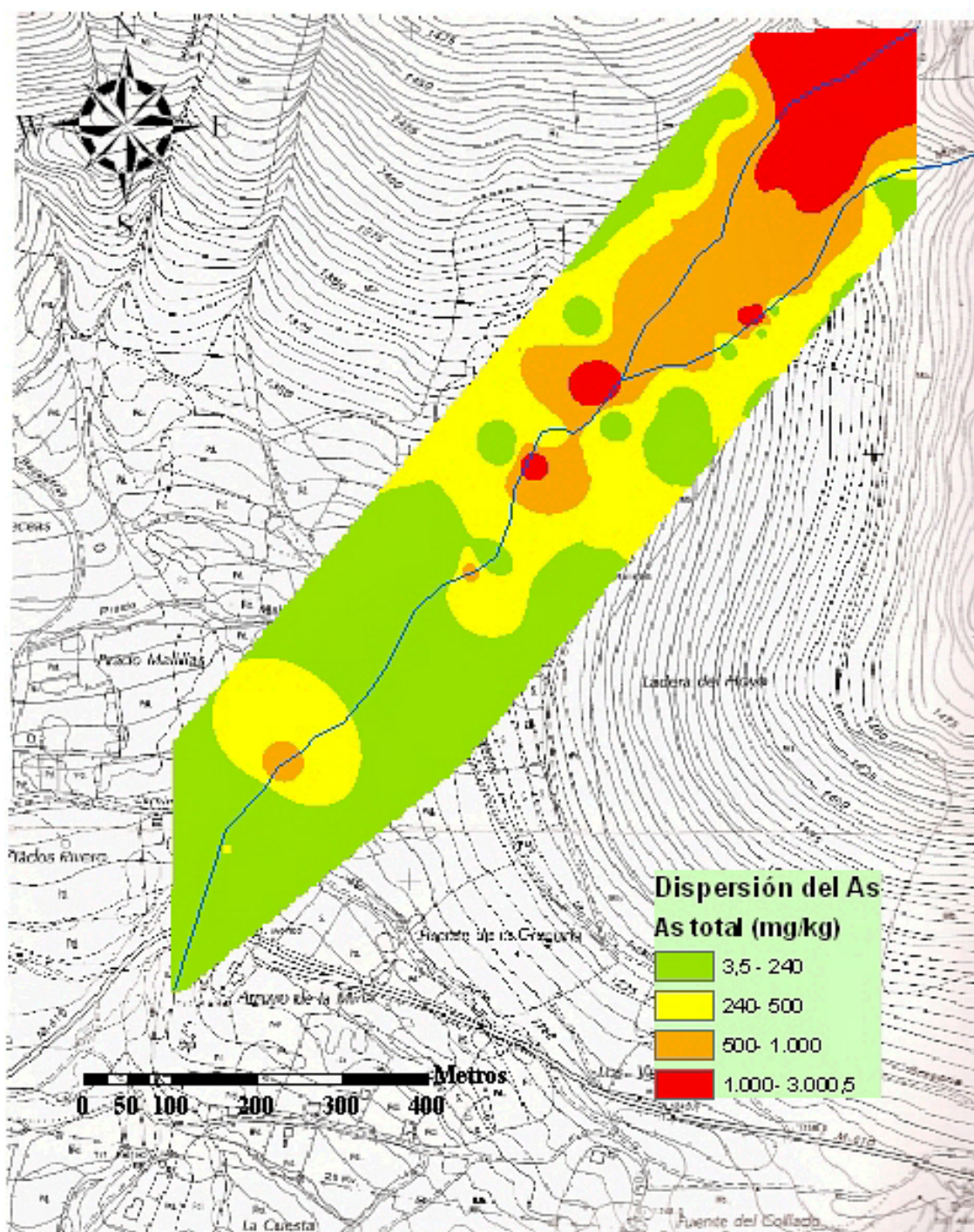


Figura 6. Dispersión del arsénico total a lo largo del área de estudio.

Los resultados de dichas publicaciones muestran niveles elevados de arsénico y de metales pesados en suelo, por encima de los límites genéricos de referencia para la protección de la salud humana establecidos por la Comunidad Autónoma de Madrid (Orden 2770/2006, de 11 de agosto de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid). Además, como se describe en dichos trabajos, de entre todas las plantas analizadas,

dos especies arbustivas, *Salix atrocinerea* y *Citrus scoparius*, son las más recomendables para la reforestación de la zona, dependiendo de la humedad de los suelos. Se describieron dos índices de acumulación de elementos traza en planta:

$$TF \text{ (factor de transferencia)} = [Me]_{\text{planta}} / [Me]_{\text{pseudo-total en suelo}}$$

$$BAF \text{ (factor de bioacumulación)} = [Me]_{\text{planta}} / [Me]_{\text{extraíble con sulfato amónico}}$$

Salix atrocinerea y *C. scoparius* presentaron para el arsénico los valores TF y BAF más elevados. Con respecto a los metales, se encontraron concentraciones elevadas de Cd y Zn en la parte aérea de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* alcanzó valores de TF próximos a 1 para el cobre.

En las Figuras 5 y 6 se muestran los mapas de la zona de estudio. Esta área es una zona escarpada, con una diferencia de altitud entre los puntos más altos de muestreo y los más bajos de 200 m y de una extensión de 225x1025 m. aproximadamente. En el mapa de la Figura 5 se han destacado algunos de los puntos de más interés, los dos arroyos que confluyen aguas abajo y los diferentes puntos de recogida de muestra de suelo y planta. En la Figura 6 se muestra la dispersión de arsénico en la zona de estudio, que alcanza valores de hasta 3000 mg·kg⁻¹. Se puede observar que alguno de los puntos más contaminados con arsénico corresponden al paso de los arroyos incluso hasta zonas aguas abajo lejanas a las escombreras.

La zona precisa someterse a un proceso de remediación que disminuya el impacto producido por las escombreras en las zonas adyacentes a ellas, y reduzca la dispersión de contaminantes a través de distintas vías como las corrientes de agua. Así mismo, es necesario minimizar la transferencia de metales y arsénico a la cadena trófica siendo útil el empleo de materiales adsorbentes que reduzcan su lixiviación y proporcionen condiciones adecuadas para el establecimiento de una cubierta vegetal. *Salix atrocinerea* y *C. scoparius* son objeto de estudio de esta tesis, puesto que se consideran dos candidatas útiles en fitorremediación de los suelos mineros de esta zona.

OBJETIVOS

- El objetivo principal de esta tesis se centra en la selección de una estrategia de remediación adecuada para suelos mineros contaminados con metales pesados y arsénico. Su aplicación debe contribuir a una reducción de la movilización de arsénico y metales y a la mejora de la calidad de los suelos.

Para ello se estudiarán los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar la capacidad de supervivencia y la respuesta de varias especies vegetales a la contaminación por arsénico y metales pesados para realizar una selección de las más útiles en revegetación y en técnicas de fitoestabilización asistida.
- Analizar el fraccionamiento de arsénico en el suelo y evaluar el efecto de las especies vegetales sobre su disponibilidad.
- Estudiar la lixiviación de arsénico y metales pesados para validar la eficacia, tanto a corto como a largo plazo, de los procesos de inmovilización de elementos contaminantes en suelos enmendados.
- Realizar una selección de bioensayos que proporcionen información sobre el progreso de la actividad remediadora.
- Seleccionar enmiendas que reduzcan la movilización de elementos traza en el suelo atendiendo tanto a parámetros químicos como biológicos.

OBJECTIVES

- The main objective is the selection of an adequate remediation strategy for multicontaminated soils containing arsenic and heavy metals. It is focused on reducing trace elements mobility and improving soil quality
- To accomplish this global aim, several partial objectives were investigated:
- To evaluate plant survival and their response to arsenic and heavy metal contaminated soils in order to select the most suitable ones for revegetation and assisted phytostabilisation techniques
- To analyse arsenic fractionation in soils and the influence of plant species on its availability
- To study arsenic and metals leaching in order to validate the efficiency of trace elements immobilisation in amended soils, both at short and long term
- To select a battery of bioassays to assess the progress of soil remediation.
- To select the most effective amendments to reduce arsenic and heavy metals mobilisation according to both chemical and ecotoxicological parameters

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen los procedimientos que se han llevado a cabo para el análisis de las muestras de cada uno de los capítulos de esta Tesis. Los materiales y métodos específicos usados en cada capítulo se describen en el apartado de Materiales y Métodos de los mismos.

1. Mineralización ácida de muestras de suelo y planta para el análisis del elemento total en suelo y planta

La mineralización de ambos materiales ha sido realizada mediante una digestión ácida en autoclave a 1,5 kg/cm², a 125 °C durante 30 minutos. El método de extracción de As en muestras de suelo y planta en autoclave ha sido previamente validado para la extracción del elemento total en ambos materiales, siendo los resultados obtenidos comparables a los obtenidos con agua regia en microondas (Moreno E., Tesis Doctoral 2010, Universidad Autónoma de Madrid).

Para las muestras de suelo, se ha toma 0,5 g de material homogeneizado en botes de autoclave, al que se le han añadido H₂O:HNO₃:H₂O₂ en una proporción 6:6:4. Los botes se dejan enfriar, se filtran y se enrasan las muestras a 50 mL con agua mQ (Wenzel et al., 2001).

Las muestras de planta han sido digeridas pesando 0,250 g de planta en botes de autoclave que se le añaden H₂O:HNO₃:H₂O₂ en una proporción 4:1,5:1. Tras dejar enfriar, se filtran y las muestras se enrasan a 15 mL con agua mQ (Lozano-Rodríguez et al., 1995).

2. Extracción del elemento disponible en suelo

Se realiza una agitación de suelo con una disolución de (NH₄)₂SO₄ 0,1 M en una proporción 1:10. Las condiciones de la agitación son 180 rpm durante 4 horas a temperatura ambiente. Las muestras son filtradas y para su conservación se le añade 0,1% (v/v) de HNO₃ concentrado (Vázquez et al., 2008). En el caso de otros tipos de extracciones, como las solubles, se especifica la manera de realizarlas en el capítulo correspondiente donde se haya llevado a cabo.

3. Análisis de elementos traza

Análisis de arsénico

La determinación de As se ha realizado por espectroscopía de fluorescencia atómica en el equipo Milenium Excalibur (PS Analytical 10.055). El fundamento del análisis se basa en la prereducción del arsénico por el ión yoduro en medio ácido seguido de una segunda reducción a arsina (AsH_3) por borohidruro de sodio (BH_4^-).

Los reactivos necesarios para el análisis son: ácido ascórbico 0,2 % (p/v), KI 2% (p/v) y HCl 25% (v/v) para la matriz en la que las muestras se diluyen y se preparan los patrones de la recta de calibrado; y NaBH_4 0,9% (p/v) y NaOH 0,4% (p/v), la disolución que se aporta de manera continua para generar arsinas, las cuales son arrastradas por una corriente de argón hacia la llama, la cual utiliza H_2 producido por la oxidación del borohidruro. En la llama el gas se atomiza y se cuantifica la concentración de As total por fluorescencia atómica.

Análisis de especiación de arsénico

A las muestras que se sometieron al análisis de especiación se les añadió Na-EDTA (concentración final de Na-EDTA en la muestra de 0,5 mM) y se congelaron a -4°C hasta su posterior análisis. Se utilizó material de referencia certificado de muestras de agua para obtener los coeficientes de recuperación. La especiación de As fue cuantificada por HPLC e ICP-MS (HP1100, Agilent Technologies) acoplado a un ICP-MS. La separación cromatografía consistió en una precolumna (11,2 mm, 12-20 μm ; Hamilton, Reno, NV, USA) y una columna de intercambio aniónico (150 x 4,1 mm, Hamilton). La fase móvil consistió en una disolución 6,66 mM de diamonio hidrógeno fosfato ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) y 6,66 mM de nitrato amónico (NH_4NO_3) ajustado a pH 6,2 con amoníaco. El patrón interno utilizado fue rodio ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). El tiempo de retención de las especies de As fue determinada usando una mezcla compuesta de $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de arsenito, arseniato, DMA y MMA. Los estándares de DMA ($0,5\text{-}25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) fueron utilizados para calibrar el instrumento.

Análisis de metales

Los metales (Cu, Mn, Zn, Fe y Cd) han sido analizados mediante Espectroscopía de Absorción Atómica (Perkin-Elmer Analyst 800) o en ICP-MS (Sciex Elan 6000, Perkin Elmer; Agilent 7500c, Japón).

4. pH y conductividad eléctrica del suelo

El análisis de pH se realizó en una suspensión 1:2,5 suelo:agua agitándolo previamente durante 10 minutos y dejando reposar. La conductividad eléctrica se realizó agitando una suspensión 1:5 suelo:agua durante 1 hora (MAPA, 1994). En el caso de otros materiales diferentes a suelo no contaminado o escombros, la forma de determinar el pH y la conductividad se muestra en el capítulo en donde esos materiales fueron utilizados.

5. Capacidad de campo del suelo

La capacidad de campo se determinó introduciendo una cantidad suficiente de suelo en botes de 50 mL. La tapa se agujereó y se sumergieron en agua durante 24 h. Tras finalizar el tiempo se dejaron desaguar los botes durante otras 24 h. Las diferencias de peso entre el material seco y húmedo constituyeron la máxima capacidad de retención de agua del material sólido.

6. Germinación

En esta Tesis se han germinado plantas de *Cynara cardunculus*, *Lupinus albus*, *Hibiscus cannabinus*, *Arrhenaterum elatius* y *Festuca curvifolia*. Estas dos últimas fueron germinadas en el propio tiesto mediante la siembra directa sobre ellos, introduciendo las semillas al menos 1 cm dentro del suelo. El suelo de los tiestos previamente se regó a su capacidad de campo, y una vez que las semillas se introdujeron, los tiestos se cubrieron con film para evitar que el suelo se secase y mantener cierto grado de humedad para que las semillas pudieran germinar. Aproximadamente en una semana las semillas germinaron.

En los ensayos de cinéticas de absorción y en hidroponía con perlita (Capítulo III.1) se germinaron semillas de *H. cannabinus*. El procedimiento consistió en un lavado previo de las semillas con agua con 10% de HClO para su esterilización durante 10 minutos más dos lavados en agua destilada durante 30 minutos cada uno. Las semillas se colocaron en recipientes herméticos sobre una capa de papel humedecido con agua. Por encima se depositó otra capa de

papel de filtro humedecido con agua y con CaSO_4 1 mM. Los recipientes se introdujeron en la estufa a 28 °C durante tres-cuatro días.

7. Tipos de cultivo

En este Tesis se han utilizado tres tipos de cultivo:

- Hidroponía pura
- Hidroponía con perlita
- Suelo

En el sistema hidropónico puro, las raíces de las plantas están en contacto directo con la disolución nutritiva. No existe ninguna otra competencia con ningún otro elemento por lo que generalmente el desarrollo radicular en este tipo de dispositivo es mayor. El pH de la disolución afecta a la disponibilidad de nutrientes, sobre todo de los micronutrientes, de forma que a un pH bajo se estimula la absorción y a un pH alto la precipitación. Se usaron contenedores de plástico de 5 L de capacidad con tapas agujereadas donde se colocaban las semillas germinadas sujetadas con algodón hidrófobo. La disolución nutritiva recibía un aporte externo de oxígeno que se realizaba mediante bombas conectadas a los contenedores de plástico con tubos de silicona. La disolución nutritiva se ajustaba a un pH entre 5.5-6 y se cambiaba semanalmente.

El sistema hidropónico con perlita es conocido como estático, en el que la disolución nutritiva humedece el sustrato por capilaridad. La perlita tiene cierta capacidad de retención de los componentes de la disolución nutritiva y de elementos traza (Moreno-Jiménez et al., 2007), por lo que se ha usado para retirar elementos traza de agua, pero se considera que es un sustrato apto para el crecimiento vegetal mostrando un aporte controlado de elementos traza a las plantas en los ensayos de dosis-respuesta (Vázquez y Carpena-Ruiz, 2005, Manzano et al., 2013). Los soportes más usados en esta Tesis son tiestos tipo 'Riviera', los cuales tienen un depósito en el que se encuentra la disolución nutritiva que es absorbida a la parte superior donde se encuentra la perlita mediante unas bandas de nylon. A partir de ahí la disolución asciende por capilaridad. La disolución nutritiva también se ajusta a unos valores de pH determinados y se renueva semanalmente.

Los ensayos restantes se realizaron en suelo, en tiestos o contenedores de mayor capacidad. Hay que destacar que en uno de los ensayos el sustrato usado fue suelo con

contaminación añadida mediante una sal de arseniato, lo que en la literatura se llama 'spiked', por lo que puede ser considerado un sistema hidropónico no puro.

8. Análisis estadístico de los datos

Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS 15.0. Los test estadísticos llevados a cabo incluyen one-way ANOVA seguido de tests post-hoc Duncan para determinar las diferencias entre las medias de cada tratamiento asumiendo una distribución normal de las variables dependientes y de la homogeneidad de las varianzas. Cuando no fue posible asumir normalidad en la distribución de los datos se realizó un análisis de los datos con pruebas tipo Kruskal Wallis junto con pruebas post-hoc Mann-Whitney. Para los casos en los que se violó la hipótesis de homogeneidad de varianzas, se utilizaron pruebas robustas de igualdad de medias, tales como Welch o Brown-Forsythe seguidos de tests post hoc Games-Howell.

En determinados capítulos se ha llevado a cabo un análisis de componentes principales. Este análisis reduce el número de variables creando componentes o factores que permiten la interpretación de un amplio número de variables. Proporciona información sobre los parámetros con mayor significación y los que explican un porcentaje más elevado de la varianza. El tipo de rotación utilizada ha sido 'Varimax', la cual proporciona una solución ortogonal.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LAS ESPECIES

VEGETALES SELECCIONADOS

PARA SU USO EN

FITORREMEDIACIÓN

CAPÍTULO III.1

ENSAYOS DOSIS-RESPUESTA DE ARSÉNICO EN SALIX ATROCINEREA, CYTISUS SCOPARIUS E HIBISCUS CANNABINUS

Los ensayos dosis-respuesta de As tienen como objetivo estudiar la respuesta de las plantas y su resistencia a determinadas dosis de arsénico en condiciones controladas, como requisito previo para su implantación en suelos contaminados.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la Introducción se ha hecho referencia al uso de plantas en programas de fitoestabilización y los requerimientos que debían poseer para ser consideradas aptas en programas de fitoestabilización. También se mencionó en los antecedentes de esta Tesis la razón por la que las especies vegetales *S. atrocinerea* y *C. scoparius* fueron seleccionadas en la continuación de los trabajos para confirmar si son potenciales candidatas para su uso en ensayos de remediación. Junto con ellas se ha seleccionado la especie *H. cannabinus* por su interés como cultivo de alta producción de biomasa.

Para proponer una tecnología de remediación en condiciones reales se requiere el estudio previo a diferentes niveles: cultivos hidropónicos en sustrato inerte, cultivos en suelo contaminado en invernadero y si es posible, ensayos en campo. En este apartado se describe el comportamiento de estas especies vegetales en hidroponía pura, el cual es un sistema de cultivo válido para estudiar la respuesta fisiológica de las plantas al estrés, en este caso causado por la exposición a dosis elevadas de As.

Los objetivos son los siguientes:

- Estudiar la resistencia de *S. atrocinerea*, *C. scoparius* e *H. cannabinus* a dos dosis de arsénico bajo condiciones controladas
- Determinar la concentración de arsénico alcanzada en plantas de *S. atrocinerea*, *C. scoparius* e *H. cannabinus* para evaluar su capacidad extractora y/o estabilizadora de As

- Analizar diferentes parámetros que proporcionan información sobre el estrés causado por su exposición al arsénico para evaluar la resistencia al As a nivel fisiológico

El objetivo global es evaluar si es posible la implantación de estas especies en suelos contaminados por residuos mineros con arsénico como parte de un programa de revegetación y remediación de estos emplazamientos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

A continuación se presentan las características morfológicas y la distribución espacial de las especies vegetales que se han seleccionado para el ensayo, así como algunas particularidades de interés para su uso en fitorremediación y producción de energía:

Salix atrocinerea L.

Es un arbusto perteneciente a la familia de las Saliáceas. Posee ramas poco densas, alargadas, las de dos años pubescentes y luego glabrescentes (desprovisto de pelos). Las hojas son oblongo-trasovadas, elípticas, lanceoladas o trasovado-lanceoladas, de ápice agudo u obtuso, base redondeada, cuneiforme. Las flores masculinas poseen estambres libres de filamentos y las femeninas se caracterizan por poseer un pistilo tomentoso (López, 2007).



Figura 7. *Salix atrocinerea* (izq.) y *Cytisus scoparius* (dcha.).

Salix atrocinerea es una de las especies más variables del género, es vicariante atlántica de *Salix cinerea* L. Las áreas de ambas se superponen parcialmente, dando lugar a la aparición del híbrido *S. x guinieri* Chass.& Goerz. Se distribuye por la Europa atlántica, Marruecos, Túnez y Córcega, siendo muy frecuente en la Península Ibérica. *Salix atrocinerea* es indiferente en cuanto

a la naturaleza del sustrato, aunque se presente de forma mayoritaria en suelos libres de carbonato. Es una especie ligada a los bordes, cauces y zonas húmedas próximas a los ríos, lo que supone unos requerimientos de humedad elevados, tanto ambientales como edáficos.

La importancia del género *Salix* en fitorremediación es bien conocida por su capacidad para acumular metales pesados. Sin embargo, la acumulación de metales pesados difiere mucho entre las diferentes especies de *Salix* y entre los clones de la misma especie (Landberg y Greger, 1996). Los antecedentes del género *Salix* como especie con valor añadido se ubican en Suecia, en donde se cultivan para obtener biomasa y para la producción de energía. La biomasa producida se utiliza en centrales térmicas para la producción combinada de calor y energía. Actualmente se cultivan en Suecia alrededor de 16.000 hectáreas de sauces en plantaciones bajas de corta rotación, compuestas principalmente de diferentes clones e híbridos de *S. viminalis*, *S. dasyclados* y *S. schwerinii*. Además, desde los años 90 existen grandes plantaciones de sauces regados con aguas residuales. Estas plantaciones también tienen su interés por su uso en fitorremediación de metales pesados, especialmente Cd (Dimitriou y Aronsson, 2005).

Cytisus scoparius

Arbusto profusamente ramificado de ramas flexibles y angulosas. Las hojas inferiores son compuestas, trifoliadas, con peciolo más o menos largo. Las superiores son aparentemente simples y carecen de peciolo o lo tienen muy corto. Las flores son amariposadas y amarillas. Habitan en terrenos silíceos o en calizos muy lavados, formando parte de los piornales y monte bajo que acompaña a los robledales, hayedos, pinares, etc. (López, 2007).

Existen antecedentes sobre la acumulación y la tolerancia de plantas del género *Cytisus* a elementos traza en minas ricas en arsénico (Bleeker et al., 2003), en concreto *C. striatus*, para el que se han descrito mecanismos de detoxificación mediados por fitoquelatinas. También se ha encontrado *C. striatus* en minas de cromo en el nordeste de Portugal, hallando Mn en grandes cantidades en sus tejidos (Freitas et al., 2004).

Hibiscus cannabinus

Esta especie es una planta anual perteneciente a la familia Malvaceae. De nombre común kenaf, se piensa que tiene su origen en el África sub-sahariana (Dempsey, 1975). El tallo del kenaf contiene dos tipos diferentes de fibras que pueden ser usadas en la producción de pulpa de papel (White et al. 1994). Aunque es originario de climas tropicales, los cultivares de kenaf se adaptan a un amplio rango de ambientes geográficos y climáticos. El interés de estos cultivares

en el ámbito de la remediación se debe a la alta cantidad de biomasa que pueden generar, lo que les permite concentrar una mayor cantidad de elemento traza. En determinados estudios llevados a cabo con *H. cannabinus*, se observó su capacidad para acumular Pb en las raíces (Wai Mun et al., 2008).

Las plantas de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* se obtuvieron de un vivero (Viveros Mañente, Lugo) y en el momento en el que sometieron al ensayo tenían un año de edad. *Hibiscus cannabinus* fue plantado a partir de semillas (suministradas por el Departamento de Medio Ambiente de la Finca La Canaleja, Alcalá de Henares, Madrid). Las plantas y semillas germinadas fueron trasplantadas a tiestos con perlita en el invernadero del departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid, bajo las condiciones de temperatura 10-28 °C y 60-80% de humedad. Las plantas leñosas fueron transferidas a tiestos tipo 'Riviera' de 20 L de capacidad (15 L de perlita y 5 L de disolución nutritiva) y las semillas de kenaf fueron plantadas en el mismo tipo de tiesto pero de 5 L de capacidad con 0,5 L para la disolución nutritiva. Antes de aplicar los tratamientos de arsénico las plantas se mantuvieron en disolución nutritiva durante tres semanas.

La composición de la disolución nutritiva para las tres especies fue la siguiente: 1,5 mM KNO₃, 1,5 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 0,75 mM K₂SO₄, 56,76 µM Fe-EDDHA, 27,3 µM MnSO₄, 0,32 µM CuSO₄, 0,77 µM ZnSO₄, 20 µM H₃BO₃, 0,016 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (Moreno-Jiménez et al., 2008). Los tratamientos de As fueron 0 (control), 50 y 250 µM As añadidos como Na₂HAsO₄·7H₂O. El pH de la disolución nutritiva se ajustaba entre 5,5 y 6,5 y se añadían 2 y 0,5 L semanalmente a cada uno de los tiestos de *Salix* y *Cytisus* por un lado e *Hibiscus* por otro. La disolución nutritiva se reponía cada semana. Las plantas leñosas y el kenaf se mantuvieron en los tiestos de perlita expuestas a los tratamientos con arsénico durante ocho y seis semanas respectivamente.



Figura 8. Aspecto de las plantas de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* durante los primeros días de tratamiento (izq.) y de las plantas de *H. cannabinus* seis semanas después del trasplante (dcha.).

2.2 Muestreo y determinaciones analíticas

Tras ocho y seis semanas de tratamiento se procedió al muestreo de las raíces y las partes aéreas de todas las plantas. Las partes aéreas de *S. atrocinerea* e *H. cannabinus* se separaron en tallos y hojas. Todos los órganos vegetales se pesaron y una parte de cada uno de ellos se secó a 60 °C durante tres días y otra se congeló con N₂ líquido y se almacenó a -80 °C.

El material vegetal seco se mineralizó en autoclave (Capítulo II, Materiales y Métodos). En el extracto se realizaron las determinaciones analíticas de P y As.

El material fresco congelado fue molido en N₂ líquido para el análisis de indicadores de estrés: clorofilas (C_I), malondialdehído (MDA) y tioles totales. En las plantas de *C. scoparius* también se realizó el análisis de glutatión (GSH) y fitoquelatinas (PCs).

2.3 Cinéticas de absorción de arsénico

Se germinaron semillas de *H. cannabinus*. Posteriormente fueron transferidas a recipientes con disolución nutritiva de la siguiente composición donde permanecieron durante dos semanas: 1,5 mM KNO₃, 1,5 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 0,75 mM K₂SO₄, 53,76 µM Fe-EDDHA, 9 µM MnSO₄, 1,6 µM CuSO₄, 3 µM ZnSO₄, 9 µM H₃BO₃, 0,03 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄. Los tratamientos fueron dos, uno con fosfato (+P) y otro sin fosfato (-P), de manera que en +P la disolución nutritiva contenía además 1 mM KH₂PO₄ y en -P el fosfato fue sustituido por 0,5 mM K₂SO₄.

Las cinéticas de absorción de As de las especies *S. atrocinerea* y *C. scoparius* se realizaron con plantas de un año de edad y se sometieron a los mismos tratamientos que *H. cannabinus* con las mismas concentraciones de nutrientes durante ocho semanas. Previamente a su transferencia al cultivo hidropónico, la morfología de estas dos especies requería de una preparación previa de las raíces y la parte aérea. Las plantas seleccionadas de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* crecían en sustrato, de forma que tras lavar las raíces se podaron aquellas que eran más viejas para poder realizar las cinéticas de absorción de As solamente con las raíces más jóvenes que fueron creciendo desde el momento de la poda. También se realizó una poda de los tallos, reduciendo en altura y ramificaciones.

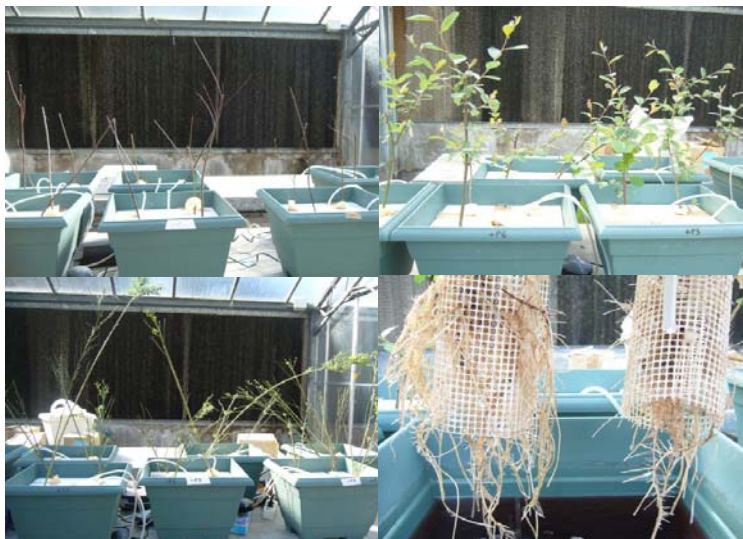


Figura 9. Plantas de *S. atrocinerea* en el ensayo de cinéticas de absorción de As.

Tanto las raíces de *H. cannabinus* en su totalidad, como las raíces jóvenes de *C. scoparius* y *S. atrocinerea* fueron sometidas al mismo ensayo de absorción de As: Las raíces se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en disoluciones de arseniato con 5, 10, 20, 50, 100 y 200 μM As añadido como $\text{NaH}_2\text{AsO}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con cuatro repeticiones por tratamiento. Esta disolución de absorción también contenía 0,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y 5 mM MES (pH 5). Posteriormente las raíces se lavaron en una disolución de fosfato a 4 °C conteniendo 1 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and 5 mM MES (pH 5 ajustado con KOH), primero durante tres minutos y después durante 10 minutos a 4 °C en otra disolución de las mismas características para movilizar el arseniato que se hubiera podido quedar adsorbida en el espacio libre intercelular. Se tomaron los pesos frescos de las raíces y se mineralizaron en autoclave (125 °C, 1,5 kg/cm², 30 minutos).

Los análisis estadísticos y las gráficas de absorción fueron realizados con el programa estadístico SigmaPlot 11.0.

2.4 Análisis de los indicadores de estrés

Las clorofilas se determinaron a partir de la homogeneización de 0,25 g de material fresco con acetona (80%). Las muestras se lavaron y se filtraron sucesivamente hasta llegar a una decoloración total de las mismas. Tras ello, las muestras se llevaron a un volumen final de 25 mL con acetona. Se midió la absorbancia a 635 y 645 nm. La concentración de clorofilas se calculó a partir de las ecuaciones de Wellburn (1994).

La concentración de MDA fue determinada añadiendo a 0,1 g de material vegetal fresco 1 mL del reactivo: TCA (ácido tricloroacético) (15%) - TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) (0,37%) -HCl

(0,25 M) con BHT (butil-hidroxitolueno) (0,01%). Las muestras se agitaron y se calentaron a 90 °C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 12000 *g* durante 10 minutos y se enfriaron en baño de hielo. La absorbancia fue determinada a 535 nm. Se restó la absorbancia a 600 nm para corregir la turbidez no específica. La concentración de MDA se calculó utilizando $1,56 \times 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción molar (Heath y Packer 1968).

Los tioles totales se determinaron a partir de 0,1 g de material vegetal fresco de raíces y de hojas. El método extractante utilizado es el referido en Jocelyn (1987). Se añadió al material vegetal fresco 400 µl de NaOH 1M con $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de NaBH_4 y 200 µl de H_2O . Las muestras se agitaron y se centrifugaron a 12000 *g* durante 10 minutos. A 500 µl del sobrenadante se añadió 100 µl de HCl (35%). De nuevo se agitaron los tubos y se centrifugaron a 12000 *g* durante 10 minutos. Posteriormente a 500 µl del sobrenadante se añadió 500 µl de reactivo colorimétrico DTNB 300 µM (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)) en tampón fosfato 0,5 M (pH 7,5). Todas las muestras se calentaron a 30 °C en baño de agua durante 2 minutos para desarrollar el color. La absorbancia fue determinada a 412 nm. A la vez se realizaron patrones de GSH tratados de la misma manera que las muestras vegetales.

Las concentraciones de GSH y PCs de *C. scoparius* fueron analizadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Agilent Technologies 1200) mediante la comparación con estándares de GSH y PCs (Peptide 2.0). 0,1 g de material vegetal fresco fue homogeneizado con HCl 0,25 M al que se le añadió 15 µl de patrón interno N-acetil-cisteína 5mM. El extracto homogeneizado se centrifugó a 14000 *g* a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró en tubos de centrífuga con membrana (VecaSpin Micro Anapore, Whatman 0,2µm) y se volvieron a centrifugar a 12000 *g* y a 4 °C durante 15 minutos más. Las muestras filtradas fueron inyectadas en el equipo HPLC (100 µl) y GSH y PCs fueron separados en una columna C18 Spherisorb 5 µm ODS2 (250×4,6 mm, Waters). Las muestras fueron sometidas a un gradiente de elución del eluyente A (98:2 H_2O /acetonitrilo (v/v) y 0,05% ácido trifluoroacético) y del eluyente B (2:98 H_2O /acetonitrilo (v/v) y 0,05 % ácido trifluoroacético). El programa del gradiente para el eluyente B fue: 2 min, 0 %; 25 min, 25 %; 26 min, 50 %; 30 min, 50 %; 35 min, 0 % and 40 min, 0 %. Se aplicó una derivación post-columna con el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), DTNB 1,76 mM en tampón fosfato 0,3 M a pH 7,5). La absorbancia fue determinada a 412 nm en un detector UV-visible.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Biomasa y síntomas visuales

No existieron diferencias significativas entre tratamientos en la biomasa de *S. atrocinerea* (Figura 10.b, $P < 0,05$), aunque la tendencia observada indica que los cambios pueden llegar a ser significativos con dosis mayores o con tiempos de exposición más prolongados (8 y 2% de reducción en 50 μM As y 21 y 14% de reducción en el tratamiento 250 μM As de la parte aérea y raíz respectivamente). Sí se observaron diferencias significativas en *C. scoparius* entre el tratamiento control y los tratamientos con arsénico (Figura 10.a, $P < 0,05$). Tanto la biomasa de la parte aérea como de la raíz disminuyeron con las dosis de arsénico. En el tratamiento 50 μM As el porcentaje de disminución en comparación con el control fue inferior que en el tratamiento 250 μM As (30 y 30% de reducción en 50 μM As y 47 y 53% de reducción en el tratamiento 250 μM As para parte aérea y raíz respectivamente). La biomasa de *H. cannabinus* sufrió la reducción más drástica de entre las tres especies (36 y 30% de reducción en 50 μM As y 58 y 77% de reducción en el tratamiento 250 μM As para parte aérea y raíz respectivamente, $P < 0,01$)

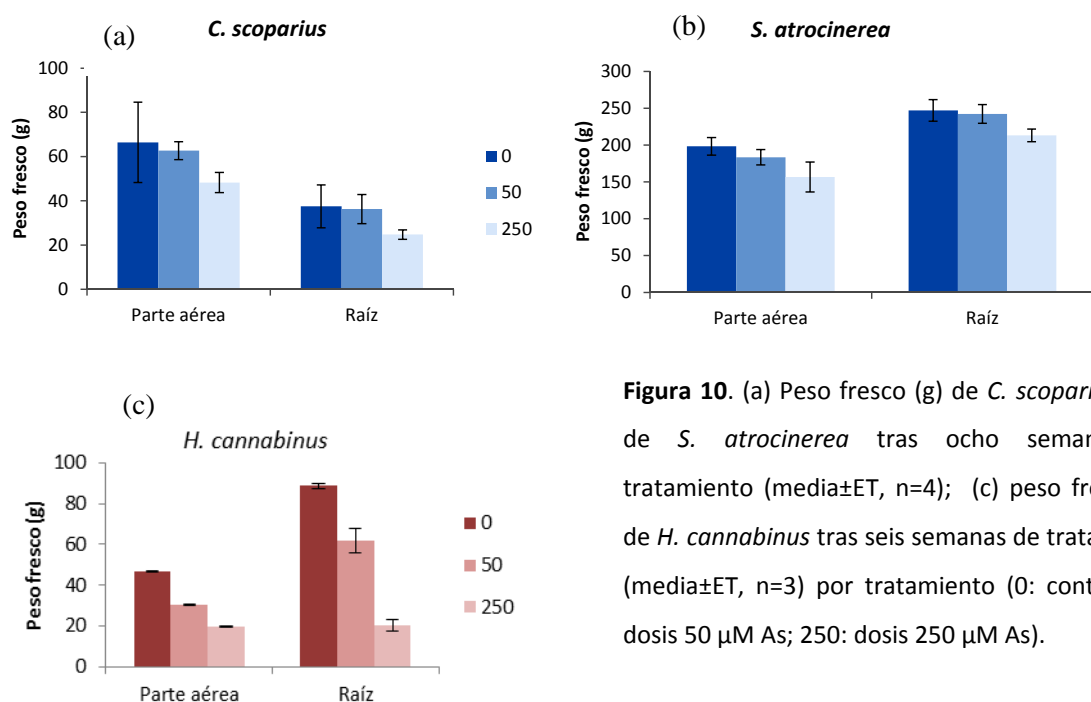


Figura 10. (a) Peso fresco (g) de *C. scoparius* y (b) de *S. atrocinerea* tras ocho semanas de tratamiento (media \pm ET, $n=4$); (c) peso fresco (g) de *H. cannabinus* tras seis semanas de tratamiento (media \pm ET, $n=3$) por tratamiento (0: control; 50: dosis 50 μM As; 250: dosis 250 μM As).

La reducción de la biomasa es el principal efecto tóxico en plantas expuestas al As (Kabata-Pendias, 2010). En comparación con el caso que nos ocupa se ha demostrado en otras especies mediterráneas que la exposición al As da lugar a una reducción de la biomasa, como por ejemplo *Retama sphaerocarpa*, *Myrtus communis* y *Arbutus unedo* (Moreno-Jiménez et al.

2008). En *H. cannabinus* además se apreciaron manchas necróticas en los márgenes de las hojas en el tratamiento 250 μM As, además de un ennegrecimiento de las raíces en ambos tratamientos de As. En las plantas de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* no se observaron otros síntomas de toxicidad, aparte del crecimiento, tales como necrosis de puntas y márgenes de las hojas, decoloración radicular o marchitamiento de las hojas, síntomas típicos descritos por Carbonell-Barrachina et al. (1998a).

Aunque el arsénico no es un nutriente esencial para las plantas, se pueden encontrar trabajos en los que se describe que el crecimiento de la planta responde positivamente a pequeñas dosis de As, como en trébol rojo con 5 y 10 $\text{mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Mascher, 2002). El arseniato puede competir con el fosfato desplazándolo del suelo y haciéndolo más disponible para la planta (Adriano, 2001). De esta manera se puede explicar la posible estimulación del crecimiento de una planta en suelos contaminados con arsénico. Sin embargo, este efecto no es atribuible en su totalidad al desplazamiento del P por el As, sino más bien es debido a una adecuada nutrición fosfórica (Carbonell-Barrachina, 1998b).

3.2 Concentración y acumulación de arsénico

Las Tablas 5-7 muestran la concentración de As en parte aérea y raíz de cada una de las especies seleccionadas. La concentración de As en las tres especies aumentó con la dosis de arsénico añadida en el medio de cultivo, siendo las raíces los órganos en los que la concentración fue mayor, lo que coincide con resultados registrados en otras especies arbustivas creciendo en un medio de cultivo similar (Moreno- Jiménez et al. 2008, 2009).

Tabla 5. Concentración de As en *S. atrocinerea* ($\mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) y relación parte aérea/raíz (PA/R). Acumulación de As entre paréntesis ($\mu\text{g As}\cdot\text{planta}^{-1}$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,01$, media \pm ET, $n=4$). n.d: por debajo del límite de detección.

As (μM)	Raíz	Hoja	Tallo	PA/R
0	n.d	n.d	n.d	
50	114,34 \pm 7,76 b (3725,5 \pm 674,5 b)	4,65 \pm 0,76 b (118,1 \pm 22,3 b)	0,14 \pm 0,04 b (2,5 \pm 1,7 b)	0,017
250	164,62 \pm 13,45 a (6533,5 \pm 757,6 a)	27,95 \pm 3,15 a (703,9 \pm 74,2 a)	4,04 \pm 0,83 a (124,3 \pm 22,3 b)	0,085

Tabla 6. Concentración de As en *C. scoparius* ($\mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) y relación parte aérea/raíz (PA/R). Acumulación de As entre paréntesis ($\mu\text{g As}\cdot\text{planta}^{-1}$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,01$, media \pm ET, $n=4$). n.d: por debajo del límite de detección.

As (μM)	Raíz	Parte aérea	PA/R
0	n.d	n.d	
50	71,48 \pm 7,24 b (402 \pm 94,3a)	2,43 \pm 0,97 a (56,0 \pm 21,2a)	0,039 \pm 0,019
250	118,24 \pm 7,28 a (596 \pm 96,7a)	3,69 \pm 0,83 a (68,2 \pm 10,5a)	0,032 \pm 0,007

Tabla 7. Concentración de As en *H. cannabinus* ($\mu\text{g As}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) y relación parte aérea/raíz (PA/R). Acumulación de As entre paréntesis ($\mu\text{g As}\cdot\text{planta}^{-1}$). Letras diferentes muestran diferencias significativas ($P<0,01$) entre tratamientos ($P<0,01$, media \pm ET, $n=3$).

As (μM)	Raíz	Hoja	Tallo	PA/R
0	0,17 \pm 0,12 c	0,30 \pm 0,18 b	0,10 \pm 0,09 b	
50	128,8 \pm 13,8 b	5,56 \pm 1,7 b	8,49 \pm 3,90 a	0,015
	(720,6 \pm 143,9 a)	(11,2 \pm 4,4 b)	(31,2 \pm 8,7 a)	
250	183,0 \pm 3,90 a	30,44 \pm 6,2 a	3,10 \pm 3,1 ab	0,059
	(437,7 \pm 40,5 b)	(37,6 \pm 6,7 a)	(7,6 \pm 3,6 b)	

Los resultados de concentración de As fueron del mismo orden para el mismo tratamiento en las tres especies. En cambio, la acumulación de arsénico varía entre las tres especies debido a las diferencias de biomasa. La relación parte aérea/raíz de las tres especies fue del mismo orden que el de otras especies: 0,001–0,014 en *Miscanthus x giganteus* (Hartley et al., 2009b), $<0,03$ en altramuz (Vázquez et al., 2005) y 0,01–0,31 en arroz (Zhang et al., 2011). Como muestra la Figura 11, la mayor parte del As absorbido por las plantas se encuentra en la raíz, teniendo limitado su transporte a la parte aérea. Consecuentemente, estas especies son exclusoras, a diferencia de las llamadas hiperacumuladoras, en las que la relación parte aérea/raíz es superior a 1. En las demás especies no hiperacumuladoras de As está documentada la baja relación parte aérea/raíz. Por tanto, ninguna de las tres especies estudiadas podría ser una buena candidata en programas de fitoextracción, pero la capacidad de acumulación de As en la raíz les hace aptas para ser utilizadas en tecnologías de estabilización de la contaminación. Sobre todo es interesante *S. atrocinerea*, por la cantidad de biomasa que genera, principalmente en raíz, y por tanto con

mayor capacidad de acumulación de As sin que sufra una reducción drástica de la biomasa por su exposición a la contaminación.

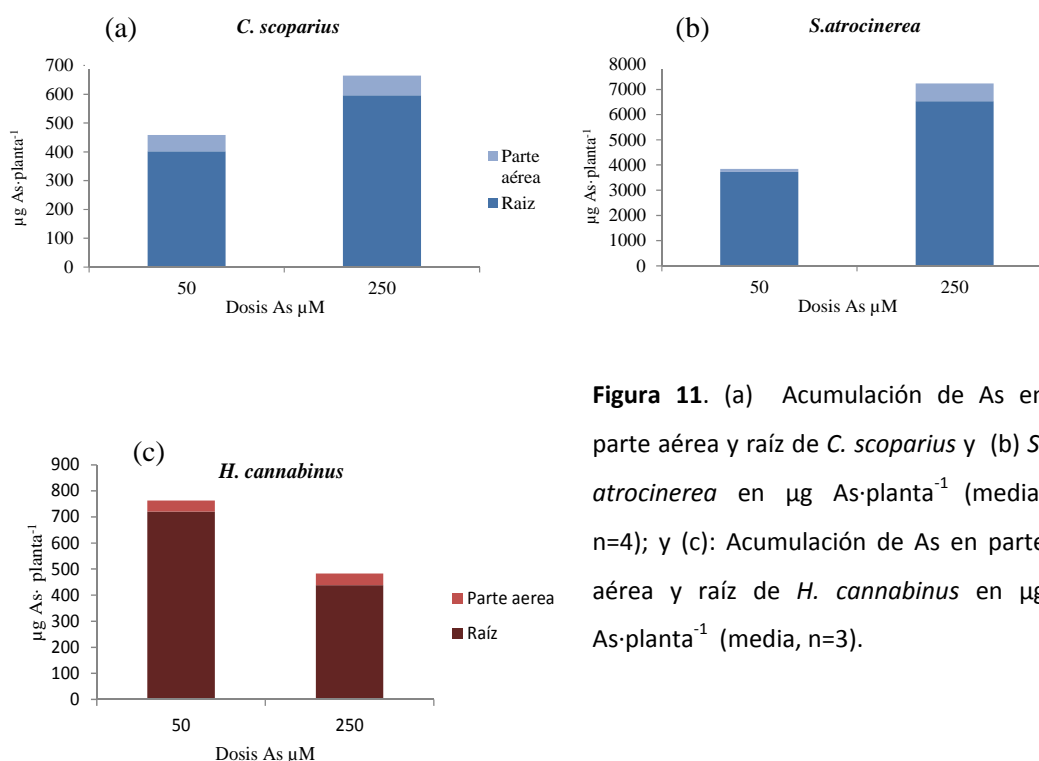


Figura 11. (a) Acumulación de As en parte aérea y raíz de *C. scoparius* y (b) *S. atrocinerea* en $\mu\text{g As-planta}^{-1}$ (media, $n=4$); y (c): Acumulación de As en parte aérea y raíz de *H. cannabinus* en $\mu\text{g As-planta}^{-1}$ (media, $n=3$).

3.3 Concentración de fósforo

La concentración de P en planta se muestra en las Tablas 8-10. Entre paréntesis se indica la relación molar entre fósforo y arsénico en cada uno de los órganos vegetales (P/As). La exposición al As causó una disminución significativa de la concentración de P en la parte aérea de *C. scoparius* y en las hojas de *S. atrocinerea* e *H. cannabinus* ($P<0,01$), mientras que no se observaron diferencias significativas en raíz. Moreno-Jiménez et al. (2008) observaron la disminución de la relación P/As con la dosis de As suministrada, tanto en raíz como en parte aérea, en plantas de mirto, retama y madroño. Esta disminución fue mayor en la parte aérea, lo cual coincide con los resultados presentados en este apartado. El porcentaje de disminución de P en la parte aérea de *S. atrocinerea* respecto al control fue 49% y 43% en los tratamientos 50 y 250 μM As respectivamente, mientras que para *C. scoparius* con la dosis más elevada de As el porcentaje de reducción con respecto al control fue de 87%. La relación molar de concentraciones P/As en las plantas fue superior a uno, disminuyendo en todos los casos de la dosis 50 μM a la 250 μM , lo que podría implicar un incremento de la toxicidad del As por

exposición a la dosis mayor. Además, la relación P/As fue superior para la parte aérea de ambas especies, lo que indicaría que la toxicidad de As puede afectar más a la raíz.

Tabla 8. Concentración de P en *S. atrocinerea* (mg P·g⁻¹ PS). Relación P/As entre paréntesis. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (P<0,01) (media±ET, n=4).

As (μM)	Raíz	Hoja	Tallo	Parte aérea
0	1,24± 0,23 a	4,52±0,66 a	0,79±0,06 a	2,12±0,21 a
50	1,50±0,11 a (32)	1,84± 0,07 b (1027)	0,58±0,58 a(14388)	1,06±0,08 b (1488)
250	1,41±0,05 a (21)	2,04±0,19 b (180)	0,64±0,04 a(417)	1,20±0,09 b (218)

Tabla 9. Concentración de P en *C. scoparius* (mg P·g⁻¹ PS). Relación P/As entre paréntesis. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (P<0,01) (media±ET, n=4).

As (μM)	Raíz	Parte aérea
0	1,15±0,19 a	0,99±0,10 a
50	1,76±0,32 a (63)	0,74±0,11 a (1133)
250	1,47±0,25 a (30)	0,13±0,03 b (99)

Tabla 10. Concentración de P en *H. cannabinus* (mg P·g⁻¹ PS). Relación P/As entre paréntesis. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (P<0,01) (media±ET, n=3).

As (μM)	Raíz	Hoja	Tallo
0	3,53±0,47 a	3,53±0,20 a	2,78±0,40 a
50	3,92±0,34(31,46) a	3,92±0,32(1042) a	3,24±,032 (427) a
250	2,23±0,86 (12,14) a	2,23±0,16(80,96) b	3,23±0,49 (1685) a

El arsénico puede sustituir al fósforo en procesos bioquímicos que tienen lugar en la planta, como en la sustitución del P en la molécula de ATP formando ADP-As inestable (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002). La concentración de fósforo en la planta puede jugar un papel importante en la protección de las membranas celulares contra el estrés oxidativo causado por la exposición al arsénico, lo que se conseguiría aumentando la concentración externa de P (Wang y Duan, 2009). Esto se ha podido observar en plantas de garbanzo (Gunes et al., 2009), trigo (Pigna et al., 2008) y *Arabidopsis* (Lee et al, 2003). La relación molar P/As en los tejidos vegetales es otro indicador de los efectos tóxicos que el arsénico puede causar (Tu y Ma, 2005). En especies mediterráneas, ratios P/As menores de 90 en parte aérea y menores de 15 en raíz

parecían estar asociados a toxicidad en términos de inhibición del crecimiento y de estrés oxidativo (Moreno-Jiménez et al., 2008). En las tres especies seleccionadas, estos ratios fueron mayores. Valores de P/As de 31 en raíz para *H. cannabinus* y de 63 para *C. scoparius* fueron suficientes para observar reducción del crecimiento. Por tanto, estas dos especies podrían ser menos tolerantes al As que las otras especies mediterráneas mencionadas.

3.4 Cinéticas de absorción de arsénico

Las cinéticas de absorción de As se muestran en la Figura 12. En la Tabla 11 se muestran todos los valores de los parámetros cinéticos así como la significación del modelo de ajuste. En *S. atrocinerea* e *H. cannabinus* se han utilizado todos los valores de arsénico para ajustar los puntos a una curva hiperbólica de tipo Michaelis-Menten y para la obtención de los parámetros cinéticos, de manera que la contribución del sistema de baja afinidad no se observa. Los valores de K_m para $-P$ son menores que los observados en $+P$, siete y cuatro veces inferiores para *H. cannabinus* y *S. atrocinerea* respectivamente. En cambio, con respecto a la velocidad máxima (V_{max}) fue mayor para las plantas del tratamiento $-P$ en ambas especies. La Figura 12 también muestra las cinéticas de absorción de arsénico de *C. scoparius*. En este caso, no existe evidencia de la existencia de dos transportadores, uno de alta afinidad (a bajas concentraciones de As en el medio) y otro de baja afinidad (a altas concentraciones de As en el medio). A pesar de ello, se obtuvo un mejor ajuste por debajo de 50 μM As, por lo que los parámetros cinéticos fueron calculados usando solo valores inferiores a 50 μM , donde el sistema de baja afinidad puede tener una menor contribución. Tras ocho semanas de crecimiento, la absorción de As fue mayor en las plantas $-P$ que en las $+P$, y al igual que en las otras dos especies, K_m fue inferior en $-P$ que en $+P$, en concreto ocho veces, lo que apunta a la existencia de una mayor afinidad de los transportadores de membrana por el arsénico en las plantas $-P$. En ambos tratamientos se obtuvieron valores de V_{max} del mismo orden. Los valores de K_m de las tres especies son altos en comparación con otras especies. Por ejemplo, en cebada, arroz y otras especies tolerantes al As como *Holcus lanatus* y *Agrostis capillaris* (6-25 μM); y muy altos comparados con el hiperacumulador *Pteris vittata* (menor de 0,97 μM , Wang et al., 2002).

La absorción de arseniato está relacionada con la nutrición fosfórica ya que arseniato y fosfato se absorben por el mismo sistema de transportadores como se ha observado en numerosas especies vegetales (Asher y Reay 1979; Meharg et al., 1994), de manera que un incremento en el estatus de fósforo en la planta conduce a una reducción de la absorción de arseniato. Las cinéticas de absorción de estas especies vegetales muestran también este

comportamiento, al igual que *C. striatus* (Bleeker et al., 2003), donde la concentración de As en la raíz fue mayor en las plantas tratadas con 10 μM P que con 100 μM P. Wang et al. (2002) indicaron que la reducción de arsénico de la solución de absorción era lenta en el tratamiento en el que las plantas crecían con fósforo (plantas +P, *P. vittata*), mientras que la reducción de As en el medio de cultivo ocurría rápidamente en las plantas que crecían sin fósforo. Esteban et al. (2003) observaron en *L. albus* que el valor de K_m para las plantas +P era 4 veces superior a las plantas -P y que los valores de V_{\max} fueron del mismo rango en ambos tratamientos. En plantas tolerantes de *H. lanatus* se encontraron valores de K_m dos veces superiores en +P que en -P (Meharg y Macnair, 1992). Por lo tanto, la inhibición de la absorción de arseniato por el fosfato tiene lugar en las tres especies, confirmando que el incremento de la concentración de fosfato en la solución nutritiva puede reducir la absorción de arseniato, contribuyendo así a aliviar la toxicidad causa por el arsénico.

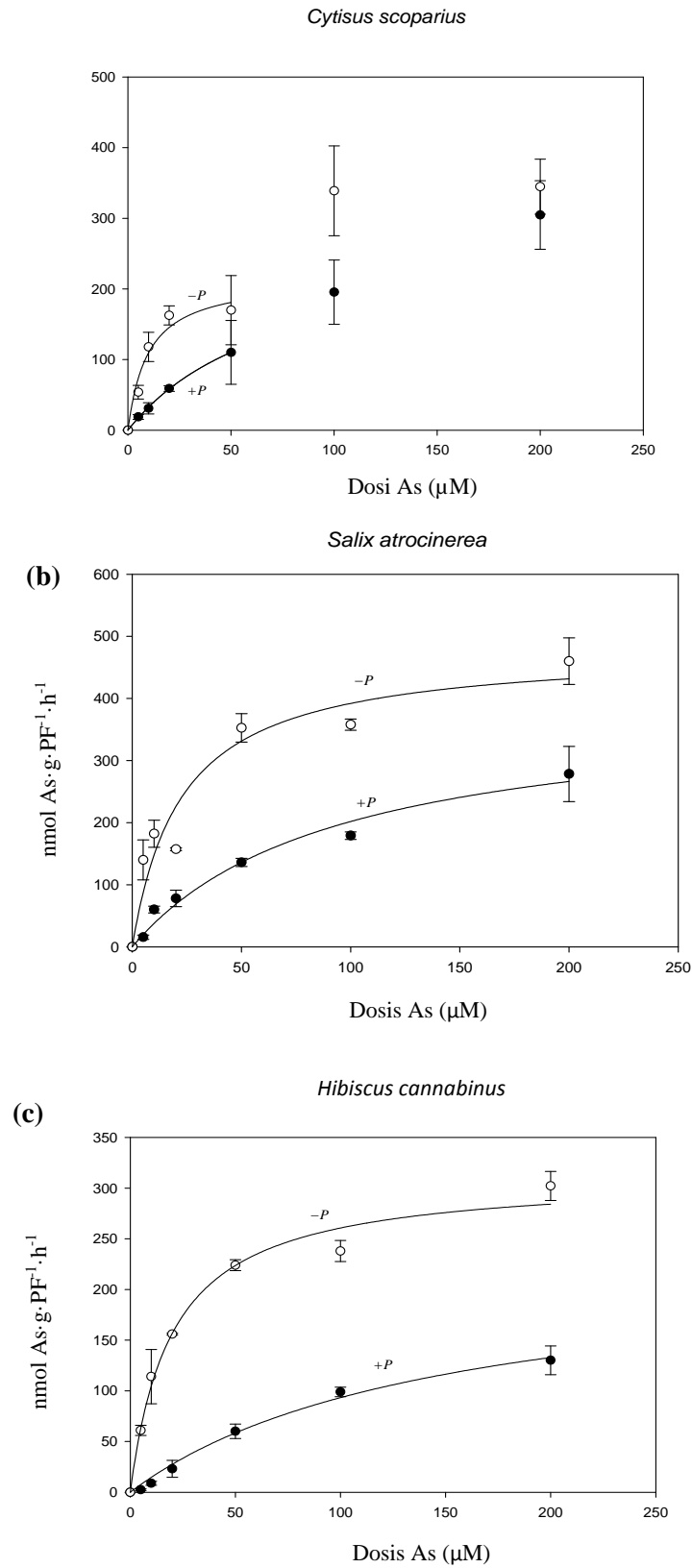


Figura 12. Cinéticas de absorción de As ($\text{nmol As} \cdot \text{g} \cdot \text{PF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) de (a) *C. scoparius*, (b) *S. atrocinerea* (media \pm ET, $n=4$) y (c) *H. cannabinus* (media \pm ET, $n=3$). Los puntos blancos se corresponden al tratamiento sin fósforo (-P) y los puntos negros al tratamiento con fósforo (+P).

Tabla 11. Parámetros cinéticos de la absorción de As para plantas que crecen con fosfato 1mM (+P) y sin fosfato (-P) (media±ET, n=4 en *S. atrocinerea* y *C. scoparius*; media±ET, n=3 en *H. cannabinus*). Se muestra el valor de R^2 y de la significación del modelo de ajuste (Sig.). V_{\max} : velocidad máxima de absorción de arseniato; K_m : constante de afinidad.

	V_{\max} nmol As·(g PF·h) ⁻¹	K_m (μM)	R^2	Sig.
<i>C. scoparius</i>				
-P	216,1±29,91	9,73±3,92	0,9593	<0,05
+P	270,8±18,18	72,8±7,36	0,9992	<0,0001
<i>S. atrocinerea</i>				
-P	480,1±53,7	22,5±8,4	0,9272	<0,001
+P	391,2±52,3	93,8±27,1	0,9782	<0,0001
<i>H. cannabinus</i>				
-P	312,4±14,7	19,8±3,2	0,9862	<0,0001
+P	230,9±26,7	147,5±31,5	0,9924	<0,0001

3.5 Indicadores de estrés

Las plantas cuentan con diversos mecanismos fisiológicos para poder sobrevivir en suelos contaminados, como son los consistentes en la restricción del influjo de arseniato y otros mecanismos constitutivos, como la síntesis de antioxidantes y de complejantes (Hartley-Whitaker et al., 2001a). La determinación de los siguientes indicadores de estrés permite evaluar la respuesta de la planta a la exposición al tóxico.

3.5.1 Clorofilas y MDA

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de Cla y Clb entre tratamientos en las plantas de *S. atrocinerea* y de *H. cannabinus* ($P < 0,05$). Sin embargo sí se observó en *C. scoparius* una disminución significativa de la concentración de Cla en los tratamientos con As con respecto al control (23 y 28 % para las dosis 50 and 250 μM As respectivamente $P < 0,01$) mientras que la concentración de Clb no se modificó. Los ratios Cla/Clb disminuyeron significativamente en las dos especies leñosas con las dosis de As, lo que indica que a largo plazo podrían tener lugar cambios en el proceso fotosintético, al igual que se ha

observado en otras especies, como en *Pisum sativum*, donde tras 32 días de exposición al arsénico la concentración de *Cla* aumentó pero el ratio *Cla/Clb* disminuyó. En cambio, no se observaron diferencias significativas en la relación *Cla/Clb* en *H. cannabinus*.

Para muchas especies de plantas, la presencia de As en el medio de crecimiento produce una disminución de la concentración de clorofilas (*Trifolium pratense* L. cv. Renova en Mascher et al., 2002; arbustos mediterráneos en Moreno-Jiménez et al. 2008; *Lemna minor* en Duman et al., 2010). Sin embargo otros trabajos registran incrementos de la concentración (*Brassica rapa* L. var. pervirdis en Shaibur y Kawai, 2009; *Azolla filiculoides* en Sanchez-Viveros et al., 2011) al igual que se observa en la *Cla* de *H. cannabinus*.

Tabla 12. Concentración de malondialdehído (MDA) y de clorofilas (Cl) y ratio *Cla/Clb* en plantas de *C. scoparius*, *S. atrocinerea* e *H. cannabinus*. Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,01$).

Tratamiento As (μM)	nmol MDA ·g ⁻¹ PF		mg Cl·g ⁻¹ PF		Ratio Cla/Clb
	Raíz	Parte aérea	Cla	Clb	
<i>C. scoparius</i>					
0	12,80±1,87 a	33,56±2,54 a	0,60±0,01 a	0,12±0,01 a	4,95±0,101 a
50	14,35±2,43 a	37,06±3,13 a	0,46±0,03 b	0,10±0,01 a	4,63±0,122 a
250	14,78±1,80 a	33,64±2,77 a	0,43±0,04 b	0,11±0,01 a	4,07±0,163 b
<i>S. atrocinerea</i>					
0	23,11±0,81 a	73,84±0,049 a	0,73±0,093 a	0,15±0,019 a	4,74±0,034 a
50	22,61±0,88 a	74,41±0,038 a	0,75±0,086 a	0,18±0,023 a	4,43±0,091 a
250	20,96±0,62 a	70,30±0,039 a	0,71±0,087 a	0,19±0,039 a	3,83±0,300 b
<i>H. cannabinus</i>					
0	45,8±4,46 a	36,6±4,45 a	0,554±0,04 b	0,122±0,10 a	4,56±0,084 a
50	36,5±1,17 a	34,5±5,70 a	0,731±0,02 ab	0,149±0,06 a	4,92±0,069 a
250	44,6±0,22 a	37,4±5,76 a	0,702±0,07 a	0,147±0,07 a	4,77±0,254 a

La exposición al arsénico puede generar la síntesis de especies de oxígeno activas e inducir la formación de productos como el MDA (Singh et al. 2007). El MDA es un producto de la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Tabla 12) y se usa como indicador de estrés oxidativo. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las especies estudiadas ($P < 0,05$), aunque generalmente se ha observado que los niveles de MDA

aumentan cuando las plantas se exponen a elementos tóxicos, como se ha encontrado en pepino (Czech et al. 2008) y en *H. lanatus* (Hartley-Whitaker et al., 2001b).

3.5.2 Glutation y fitoquelatinas

En este apartado se muestran los resultados del análisis de glutatión (GSH) y fitoquelatinas (PCs) en *C. scoparius* y tioles totales (-SH) en *S. atrocinerea* e *H. cannabinus*.

La síntesis de fitoquelatinas (PCs) en plantas bajo exposición a arsénico es un fenómeno demostrado por espectroscopía de masas de ionización por electrospray y por espectroscopía de absorción de rayos X (Schmöger et al., 2000; Pickering et al., 2000). La síntesis de PCs se relaciona directamente con el grado de estrés producido por la presencia de elementos tóxicos en la planta y se ha sugerido que la detoxificación mediante fitoquelatinas es un mecanismo esencial (Hartley-Whitaker et al., 2002).

GSH y PCs en *C. scoparius*

La concentración de GSH y PCs se muestra en la Figura 13. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de GSH en las raíces entre tratamientos, pero no en parte aérea ($P < 0,05$). La concentración de GSH en las raíces del tratamiento 250 μM As fue el doble de la del control. Con respecto a las PCs, en la parte aérea se encontró PC2 en los tratamientos con arsénico, mientras que no fue posible observar PCs en el tratamiento control. En las raíces se observaron PCs de mayor longitud junto con PC2, como PC3 y PC4. Un comportamiento similar ocurre en plantas de *Silene vulgaris*, en las que se sintetizó PCs de mayor peso molecular cuando se aplicaron dosis altas de As (Sneller et al., 1999). En *C. scoparius* se observaron incrementos marcados en PC3 y PC4 en las raíces con la dosis 250 μM con respecto a la dosis 50 μM , siendo 6 y 11 veces superior respectivamente. Además, los niveles de GSH no disminuyeron en las raíces de las plantas tratadas con As a pesar de la síntesis de PCs (Figura 13.b), lo que es importante debido al papel antioxidante que desempeña la molécula de GSH (Foyer y Noctor, 2005). En *C. striatus* y *H. lanatus* el nivel de PCs aumentó bajo exposición al As, tanto en plantas tolerantes como en no tolerantes (Hartley-Whitaker et al. 2001a; Bleeker et al. 2003). Sin embargo, se ha observado que la tolerancia al As de plantas metalíferas como *Silene paradoxa* depende de mecanismos de complejación diferentes de la síntesis de PCs (Arnetoli et al., 2008), como en el caso de las hiperacumuladoras (Zhao et al., 2003).

Los ratios molares PC:As (Tabla 13) aumentaron en las raíces en la dosis 250 μM As con respecto a la dosis 50 μM As. En la parte aérea los ratios GSH/As fueron mayores que los ratios

PC/As. Este índice (-SH/As) muestra la abundancia relativa de GSH y PCs que pueden complejar arsénico. Se ha descrito que un ratio mayor de 3 implica la existencia de suficientes grupos tioles para complejar As, mientras que ratios inferiores a 3 indican que no todo el As puede ser complejoado por los grupos tioles (Sneller et al., 1999; Schmöger et al., 2000; Hartley-Whitaker et al., 2001a, 2002; Vázquez et al., 2005). Los resultados muestran que hay suficientes grupos -SH, sobre todo suministrados por el GSH, disponibles para complejar As en la parte aérea. Por el contrario, los bajos valores del ratio en raíz indican que no hay suficientes grupos tioles disponibles para complejar todo el As de las raíces a pesar del incremento de los niveles de PCs en estos órganos vegetales.

Tabla 13. Ratios -SH (GSH PCs):As ratios para la parte aérea y la raíz de *C. scoparius*. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos para cada órgano vegetal ($P < 0,01$) (media \pm ET, n=4).

As (μ M)	Raíz		Parte aérea	
	GSH:As	PC:As	GSH:As	PC:As
50	0,103 \pm 0,008 a	0,508 \pm 0,144 b	14,19 \pm 5,71 a	0,905 \pm 0,24 a
250	0,076 \pm 0,006 a	1,85 \pm 0,263 a	6,17 \pm 1,08 a	0,285 \pm 0,147 a

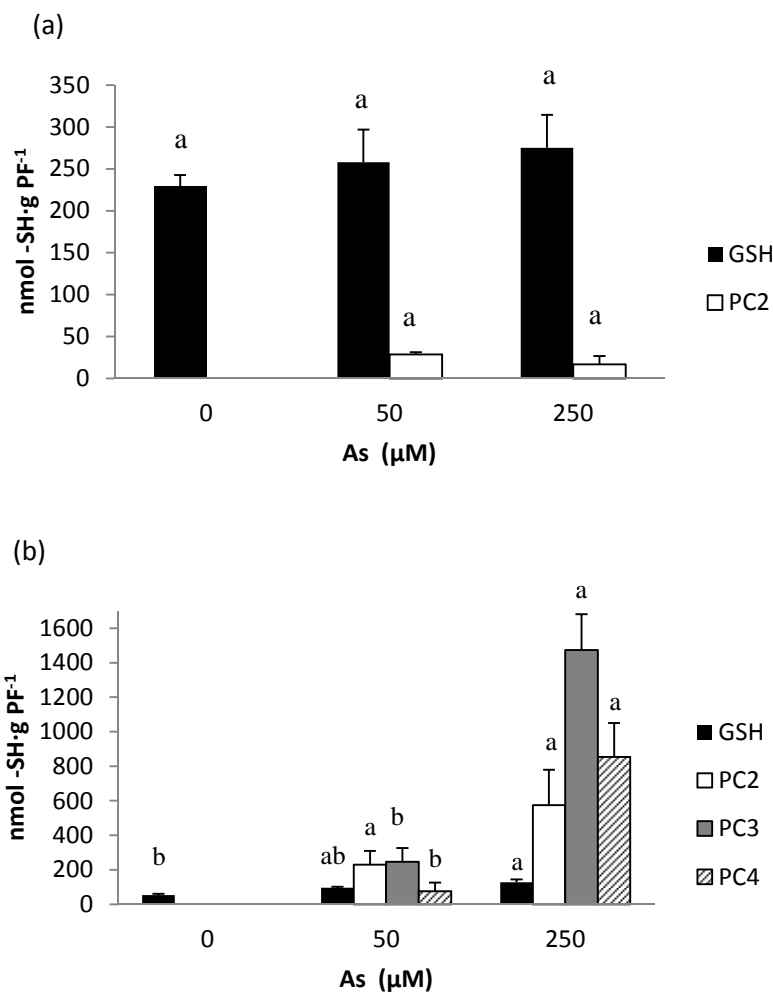


Figura 13. Concentración de GSH y PCs en la parte aérea y raíz de *C. scoparius*: (a) nmol-SH referidos al patrón interno N-acetil-cysteina·g PF⁻¹ en parte aérea, no existen diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$); (b) concentración de GSH y PCs SH referidos al patrón interno N-acetil-cysteina·g PF⁻¹ en la raíz. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos para cada molécula ($P < 0,05$) (media±ET, n=4).

Tioles totales en *S. atrocinerea* e *H. cannabinus*

No fue posible obtener una cuantificación de GSH y PCs de *S. atrocinerea* mediante HPLC debido a la sobrepresión del sistema, probablemente ocasionado por la precipitación de algún compuesto cuando la muestra entraba en contacto con el reactivo Ellman. La determinación colorimétrica de tioles totales ofreció un problema similar, de manera que los blancos de muestra presentaban una absorbancia con una variabilidad muy alta, por lo que no fue posible determinar la concentración real de tioles en la muestra. Sin embargo no existe evidencia de que

la interacción de la muestra con el reactivo de Ellman fuera diferente entre los tres tratamientos aplicados, por lo que se ha determinado el porcentaje de aumento de la concentración de tioles totales en los tratamientos con arsénico con respecto al total, siendo un análisis cualitativo de la existencia de tioles (Tabla 14). Existen referencias en la bibliografía que indican que en otras especies de *Salix* no se han detectado PCs (Landberg y Greger, 2004), en concreto en plantas de *S. viminalis* expuestas a Cd, argumentando como posible explicación la adaptación de las plantas al medio contaminado durante tratamientos de larga duración.

Tabla 14. % de aumento de la concentración de tioles totales en *S. atrocinerea* respecto al control, media, n=4.

Tratamiento As (μM)	Hoja	Raíz
50	96	122
250	64	14

En cambio sí fue posible determinar la concentración de tioles totales de *H. cannabinus* (Tabla 15). Se observó un incremento de los grupos tioles en las raíces de la dosis 250 μM con respecto al control. En la parte aérea no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, lo que es de especial interés por el ya mencionado papel antioxidante que desempeñan los grupos tioles.

Tabla 15. Concentración de grupos tioles ($\text{nmol-SH}\cdot\text{g PF}^{-1}$) en la parte aérea y raíz de *H. cannabinus*. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos en cada órgano vegetal ($P<0,05$, media \pm ET, n=3).

As (μM)	Hojas	Raíz
0	302 \pm 40,9 a	30,65 \pm 7,01 b
50	271,1 \pm 11,0 a	189,77 \pm 29,70 b
250	303,2 \pm 43,2 a	664,63 \pm 105,51 a

4. CONCLUSIONES

- El aporte de arseniato en dosis 50 y 250 μM en hidroponía con perlita produjo reducciones significativas del crecimiento de *H. cannabinus* y en menor medida de *C. scoparius* pero no de *S. atrocinerea* aunque la tendencia indica que la reducción se puede producir con dosis más altas o tiempos más prolongados de exposición
- La concentración y la acumulación de As en los tejidos vegetales aumentó con la dosis de As añadida a la disolución nutritiva. La acumulación de As fue superior en *S. atrocinerea*, tanto en raíz como en parte aérea. La raíz fue el órgano vegetal que más concentró y acumuló As en las tres especies, por lo que todas presentan carácter excludor
- Los indicadores de estrés MDA y clorofilas ponen de manifiesto cierta tolerancia de las tres especies al As, sobre todo de *S. atrocinerea*. También podría producirse un efecto protector del P frente a la toxicidad de As, sobre todo en raíz
- En respuesta al As, *C. scoparius* sintetizó fitoquelatinas sin que hubiera una reducción de la concentración de GSH. En parte aérea únicamente fue observada PC2 y en raíz PC2, PC3 y PC4. Los niveles de tioles totales en *S. atrocinerea* y en *H. cannabinus* también aumentaron con la presencia de As. Todo ello señala que la complejación del As con grupos tiólicos es un posible mecanismo de detoxificación del arsénico en estas especies vegetales
- La capacidad de acumular As en las raíces, la resistencia a la exposición a altos niveles de arseniato, la baja respuesta por estrés y la evidencias en cuanto a la existencia de mecanismos detoxificadores de As, indican el prometedor uso de plantas leñosas como *S. atrocinerea* y *C. scoparius* en fitorremediación de suelos mineros contaminados con As. Debido a su menor resistencia al arsénico (reducción del crecimiento), las plantas de *H. cannabinus* se descartaron para ensayos posteriores

4. CONCLUSIONS

- Plants of *C. scoparius* and *H. cannabinus* exposed to two doses of arsenate, 50 and 250 μM , growing on perlite, had significantly reduced biomass yield, particularly *H. cannabinus*. There were no significant differences among treatments in the biomass of *S. atrocinerea*, but the observed trend indicated that changes may occur with higher As doses or longer exposure times
- As concentration and accumulation in plant tissues increased with As dose. The highest accumulation was found in *S. atrocinerea*, both in roots and above ground biomass. For the three plant species, roots displayed the largest As accumulation, highlighting that these plant species behave as As excluders
- Stress indicators (MDA and chlorophylls) highlight a certain tolerance to As, especially in *S. atrocinerea*. A protective role of phosphorous against As toxicity, mainly in roots, may also take place
- In response to As, plants of *C. scoparius* synthesised phytochelatins without a concomitant effect on GSH reduction. In above ground tissues only PC2 was detected, while PC2, PC3 and PC4 were found in roots. Total thiol levels in *S. atrocinerea* and *H. cannabinus* also increased with arsenate exposition. All these findings support the theory that As complexation with thiols is an efficient mechanism in the detoxification of arsenic in these three plant species
- Arsenic accumulation in roots, resistance to high levels of arsenate exposure, low stress and evidences of detoxification mechanisms indicate that phytostabilisation in As-mine soils using woody plants such as *S. atrocinerea* and *C. scoparius* is a promising phytotechnology. Because of its lower resistance to arsenate (higher growth reduction), *H. cannabinus* was discarded from further experiments

CAPÍTULO III.2

ENSAYOS EN INVERNADERO EN MESOCOSMOS: ESPECIES ARBUSTIVAS EN SUELOS MULTI-CONTAMINADOS Y EN SUELOS CON ARSÉNICO AÑADIDO

Los ensayos en mesocosmos permiten estudiar el comportamiento de especies vegetales ante un evento de contaminación mediante un seguimiento del suelo y de la planta.

1. OBJETIVOS

- Determinar la supervivencia de las plantas y evaluar su adaptación a medios contaminados para conocer su utilidad en la fitorremediación de suelos mineros
- Estudiar el efecto de distintas especies vegetales sobre la disponibilidad de As y metales en suelos que han sido contaminados con arsénico añadido (Ensayo 1) y en suelos contaminados procedentes de la mina Mónica de arsenopirita (Ensayo 2)
- Determinar en qué fracciones del suelo se encuentra retenido el As en suelos cultivados y sin cultivar

ENSAYO 1. SUELOS CON ARSÉNICO AÑADIDO

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este ensayo se han cultivado tres especies vegetales:

- Dos especies leñosas, autóctonas de la mina de arsenopirita en Bustarviejo (Madrid): *S. atrocinerea* (S.a) y *C. scoparius* (C.s)
- Una especie seleccionada por su interés en la producción de biomasa: cardo, *Cynara cardunculus* (C.c)

Se han descrito brevemente las características morfológicas y los principales usos de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* en el Capítulo III.1. Las de *C. cardunculus* se muestran a continuación:

Cynara cardunculus

Cynara cardunculus presenta una gran roseta de hojas muy divididas y de color grisáceo con espinas en su margen. En su floración crece el tallo, que puede elevarse más de un metro y medio del suelo. En la parte superior se encuentran los capítulos consistentes en grandes flores de tonalidad azul y con grandes espinas (Fuente: Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental, herbarivirtual.uib.es). Es un cultivo con interés industrial



en la producción de biomasa con fines energéticos (Gominho et al., 2011) y en la producción de biodiesel a partir de las semillas. Otros usos no energéticos incluyen la producción de pulpa de papel, forraje para rumiantes y extracción de principios activos farmacológicos (Fernández et al., 2006). Aparte de los usos industriales, se ha estudiado su capacidad fitoextractora de elementos traza, tales como As y Cd (Hernández-Allica et al., 2007; Llugany et al., 2012).

Las dos especies leñosas (*S. atrocinerea* y *C. scoparius*) provinieron de vivero y se trasplantaron cuando tenían un año de edad. *Cynara cardunculus* se obtuvo a partir de semillas

suministradas por el Centro de Investigación Agraria La Orden-Valdesequera (Junta de Extremadura). Las semillas fueron germinadas en estufa durante 4-5 días, cultivadas en turba durante un mes y trasplantadas posteriormente a los tiestos.

El suelo utilizado es el suelo control procedente de los alrededores de la mina (no contaminado), seco, tamizado a 4 mm y homogeneizado en hormigonera.



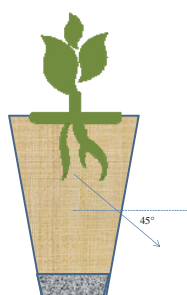
Figura 14. Vista general del ensayo en un estado avanzado.

Se utilizaron tiestos de capacidad 5 L y dimensiones 17x30 cm (diámetro x altura), agujereados por la base para permitir la salida de los lixiviados. Se rellenaron con suelo no contaminado y grava (diámetro 3-5 mm) en una proporción 60:40 p/p hasta llegar a una cantidad total de 8 kg. La mezcla entre suelo y grava se hizo de forma manual tiesto por tiesto. La parte inferior del tiesto fue rellenada con 2 cm de la misma grava para evitar la pérdida de suelo durante el riego. Los tiestos se colocaron dentro de cubos donde se recogían los lixiviados, que eran reabsorbidos por los suelos. Se agujerearon a la mitad de su altura para insertar sondas de succión de la disolución del suelo (también llamada agua intersticial), en un ángulo de 45° con la horizontal (Eijkelpamp Agrisearch Equipment, Holanda, 10 cm de longitud, 2,5 mm de diámetro). Los suelos fueron contaminados con dos dosis de As: 30 mg·kg⁻¹ (D30) y 90 mg·kg⁻¹ (D90) de As añadido como Na₂HAsO₄·7H₂O en forma líquida, de manera que el volumen de la disolución de arseniato añadido fue el necesario para que los tiestos quedasen saturados a capacidad de campo (previamente determinada). Los tiestos se dejaron equilibrar durante un mes. Tras este periodo se realizó una fertilización con 500 mg de fertilizante NPK 8-24-8 y una segunda seis meses después con las mismas dosis de fertilizante. Transcurrido el mes de equilibrado se procedió al trasplante de una planta de *S. atrocinerea*, *C. scoparius* y *C. cardunculus* por tiesto. Se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento junto con cuatro repeticiones de tiestos sin planta (NP) por dosis de As (se detalla un esquema en la Figura 15). Los tiestos se mantuvieron en el invernadero de la Universidad Autónoma de Madrid durante seis meses más. En las etapas finales del ensayo los tiestos se trasladaron a una cámara exterior con cubierta hasta finalizar el ensayo. En la Tabla 16 se muestra un cronograma del ensayo.

Tabla 16. Cronograma del ensayo con adición de arsénico.

Fecha	Suelo			Disolución del suelo
12-nov-09	Preparación tiestos Adición de As	Inicio equilibrado		
09-dic-09		Fin equilibrado	Trasplante	
14-dic-09	Fertilización 1			
16-dic-09				Muestreo 1
18-ene-10			Muestreo 1	
21-ene-10			pH 1	Muestreo 2
3-feb-10			pH 2	Muestreo 3
17-feb-10			pH 3	Muestreo 4
03-mar-10				Muestreo 5
17-mar-10			Ext. sec. Intermedio	Muestreo 6
30-mar-10			pH 4	Muestreo 7
14-abr-10				Muestreo 8
28-abr-10				Muestreo 9
03-may-10	Fertilización 2			
12-may-10				Muestreo 10
02-jun-10				Muestreo 11
23-jun-10			Ext. sec. Fin pH 5	Muestreo 12

Una vez puesto en marcha el ensayo, los tiestos se regaban por pesada de forma periódica. Cada quince días se realizaba una extracción de la disolución del suelo, muestreada después del riego, mediante la colocación de un tubo de vacío en el exterior de la sonda. En las extracciones se analizaron pH y la concentración de As, de manera que al finalizar el ensayo se contaba con un total de doce extracciones de cada uno de los tiestos.



n=4	No planta (NP)	S.a	C.s	H.c	C.c
30 mg·kg ⁻¹					
90 mg·kg ⁻¹					



Figura 15. Foto de la sonda de succión y esquema del tiesto y de los tratamientos aplicados con las dos dosis de arsénico añadidas.

El pH de los suelos se determinó en cinco momentos del ensayo, repartidos en seis meses, con suelo obtenido mediante perforaciones usando tubos de 2 cm de diámetro que abarcasen la longitud del tiesto, para recoger una fracción de todo el perfil. El suelo recogido se homogeneizó a mano para tener una muestra representativa de todo el tiesto, se secó y se tamizó a 2 mm.

Se realizó una extracción secuencial de As en el suelo en dos momentos del ensayo (Tabla 17, Wenzel et al., 2001):

- Intermedio: tres meses después del trasplante. Este muestreo se obtuvo realizando perforaciones en el suelo usando el mismo procedimiento que para el análisis de pH.
- Final: tres meses después del muestreo intermedio. La totalidad del suelo del tiesto se homogeneizó a mano, del que se tomó una fracción.

Tabla 17. Pasos de la extracción secuencial del As.

Fracción	Extractante	Fracción	Condiciones	Ratio Suelo:extractante (g·mL ⁻¹)	Lavado
1	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,05 M	No específica- mente retenido	Agitación durante 4 h a 20 °C	1:25	
2	(NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,05 M	Específica- mente retenido	Agitación durante 16 h a 20 °C	1:25	
3	Oxalato amónico 0,2M; pH 3,25	Asociado a óxidos amorfos de Fe y Al	Agitación durante 4 h a 20 °C en oscuridad	1:25	Agitación durante 10 min en oscuridad con oxalato amónico 0,2 M, pH 3,25; ratio 1:12,5
4	Oxalato amónico 0,2 M + ácido ascórbico 0,1M; pH 3,25	Asociado a óxidos cristalinos de Fe y Al	30 min a 96±3 °C	1:25	Agitación durante 10 min en oscuridad con oxalato amónico 0,2 M, pH 3,25; ratio 1:12,5
5	HNO ₃ : H ₂ O ₂ : H ₂ O	Residual	Digestión ácida en autoclave (HNO ₃ , H ₂ O ₂ ; H ₂ O 6:4:6)	1:50	

Seis meses después del trasplante se procedió al muestro final de suelo y planta. Se homogeneizó el suelo de cada tiesto a mano y se recogió una fracción para su análisis. Los suelos se secaron al aire durante una semana y se tamizaron a 2 mm para la realización de las determinaciones analíticas.

La raíz y la parte aérea de las plantas se lavaron con agua del grifo y agua destilada, retirando las partículas de suelo que pudieran quedar adheridas a la superficie de la raíz. Tras limpiarlas cuidadosamente, se secaron tanto raíces como partes aéreas en estufa durante 3 días a 60 °C y se molieron a 0,5 mm. Este material se sometió a una mineralización ácida (ver M&M) y en el extracto mineral se analizó la concentración de As en raíz y parte aérea.

Para el análisis estadístico de los datos se han utilizado los métodos descritos en M&M. Además, se han realizado análisis de varianza de dos o más factores en MiniTab 16.0.

3. RESULTADOS

3.1 Suelo y disolución del suelo

3.1.1 Valores de pH

Se analizó el pH del suelo en cinco momentos distribuidos en los seis meses que duró el ensayo (Figura 16). El análisis de la varianza (Tabla 18) muestra que existieron diferencias significativas en el pH del suelo según el tipo de cultivo (tiestos con y sin planta), la dosis de As y el momento de muestreo. La adición de una cantidad superior de hidrógeno arseniato de disodio en D90 contribuyó a que el valor inicial de pH fuera mayor que en la dosis D30 pero los valores finales de pH fueron similares en ambas dosis de As, a pesar de ese incremento inicial. En D30, los valores de pH más bajos se registraron en los tiestos sin planta junto con los tiestos donde crecían *S. atrocinerea* y *C. cardunculus* (Tabla 18). En la dosis D90, la tendencia observada mostraba que los tiestos sin planta registraban los valores más bajo de pH, pero estadísticamente no existieron diferencias entre los tipos de cultivo.

Paralelamente, se analizaron los valores de pH en la disolución del suelo (Figura 17) recogida con 'sondas Rhizon' (Eijkelkamp, 10 cm longitud, 2,5 mm de diámetro <0,22 µm tamaño de poro de la capsula cerámica). Se observa, al igual que en el suelo, que los valores de pH evolucionaron conjuntamente, siendo los muestreos intermedios, entre las fracciones 5-9, donde se registraron los valores más elevados de pH en ambas dosis de As (datos estadísticos no mostrados). De manera similar que en los análisis de pH del suelo, en la dosis D30 el pH de la disolución del suelo en los tiestos sin planta fue significativamente más bajo (junto con los tiestos donde crecía *S. atrocinerea*, Tabla 19) y en la dosis D90 no existieron diferencias significativas entre cultivos. Para la dosis baja de As, D30, la presencia de plantas produjo un ligero incremento del pH. Un efecto similar se encontró en suelos cultivados con *L. albus*, donde los suelos en los que crecía esta especie registraron valores de pH superiores a los suelos no cultivados (Vázquez et al., 2006). Sin embargo, en la dosis D90, la presencia de plantas no modificó el pH del suelo, al menos durante el tiempo que duró el ensayo (Tabla 19).

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

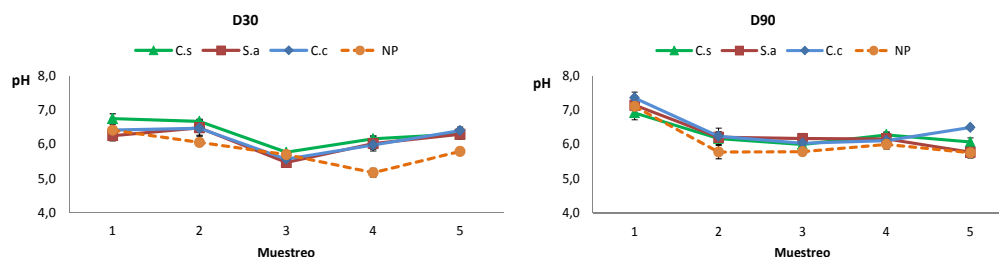


Figura 16. Valores de pH en suelo en las dosis D30 (izq.) y D90 (dcha.) de los suelos cultivados (S.a, C.s y C.c) y sin planta (NP). C.s: *C. scoparius*; S.a: *S. atrocinerea*; C.c: *C. cardunculus*; NP: no planta. Media±ET, n=4.

Tabla 18. Estadística asociada a la Figura 16 del pH del suelo. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre cultivos por dosis de As ($P < 0,001$). C.s: *C. scoparius*; S.a: *S. atrocinerea*; C.c: *C. cardunculus*; NP: no planta

ANOVA		Comparación Post-hoc Cultivo (Tukey, 99%)	
Cultivo	< 0,001	D30	Cc ab
Dosis	< 0,001		Sa ab
Muestreo	< 0,001		Cs a
Cultivo*Dosis	<0,1		NP b
Cultivo*Muestreo	<0,1	D90	Cc a
Muestreo*Dosis	< 0,001		Sa a
			Cs a
			NP a

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

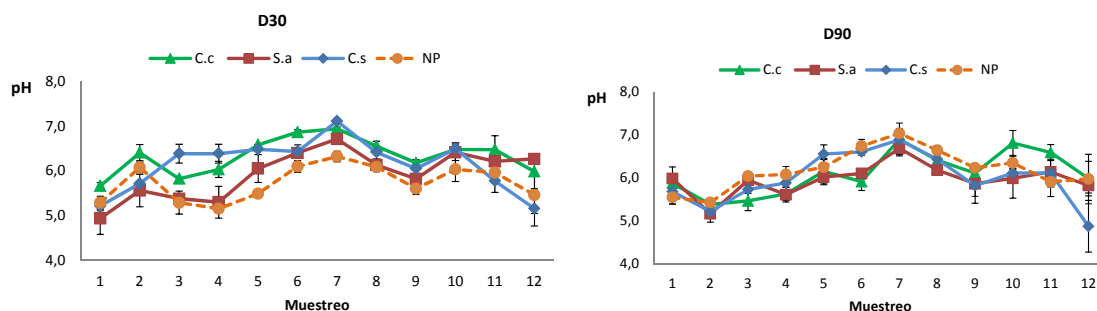


Figura 17. Evolución del pH en la disolución del suelo durante 6 meses en las dosis D30 (izq.) y D90 (dcha.) de los suelos cultivados (S.a, C.s y C.c) y sin planta (NP). C.s: *C. scoparius*; S.a: *S. atrocinerea*; C.c: *C. cardunculus*; NP: no planta. Media \pm ET, n=4.

Tabla 19. Estadística asociada a la Figura 17 del pH de la disolución del suelo. Letras diferentes muestran diferencias significativas en función del cultivo en cada dosis ($P < 0,001$). C.s: *C. scoparius*; S.a: *S. atrocinerea*; C.c: *C. cardunculus*; NP: no planta

ANOVA		Comparación Post-hoc Cultivo (Tukey, 99%)	
		D30	
Cultivo	< 0,001	Cc	a
		Sa	bc
		Cs	ab
		NP	c
Dosis	< 0,001		
Muestreo	< 0,001		
Cultivo *Dosis	n.s	D90	
Cultivo *Muestreo	n.s	Cc	a
Muestreo*Dosis	< 0,001	Sa	a
		Cs	a
		NP	a

3.1.2 Concentración de As en la disolución del suelo

Los resultados obtenidos para la concentración de As en las muestras de la disolución del suelo se muestran en la Figura 18.

Los análisis estadísticos muestran la existencia de diferencias significativas entre los diferentes cultivos y dosis de As, pero no con respecto al muestreo. Se observaron diferencias significativas en la interacción Cultivo*Dosis (Tabla 20). En la dosis D30 no se observaron

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

diferencias entre los tipos de cultivo, aunque los valores fueron siempre inferiores a los obtenidos en D90. Para la dosis más elevada de As, D90, la concentración de As en la disolución del suelo se redujo en los tiestos donde crecía *C. scoparius*, pese a no haber encontrado diferencias significativas en el pH.

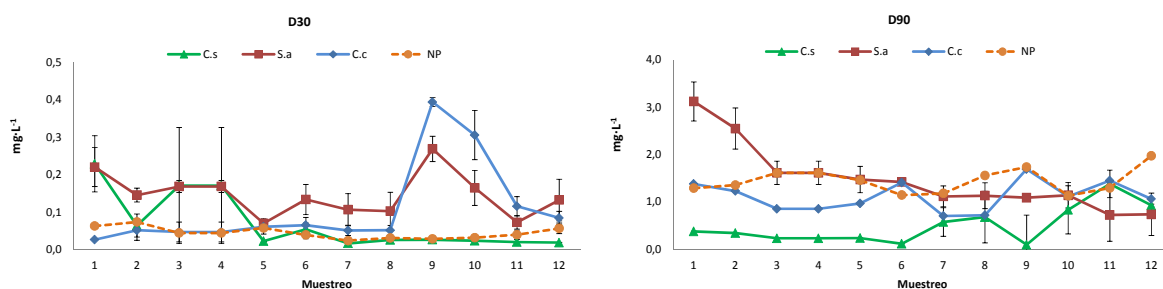


Figura 18. Concentración de As en la disolución del suelo ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en las dosis D30 (izq.) y D90 (dcha.) de los suelos cultivados (S.a, C.s y C.c) y sin planta (NP). C.s: *C. scoparius*; S.a: *S. atrocinerea*; C.c: *C. cardunculus*; NP: no planta. (media \pm ET, n=4).

Tabla 20. Estadística asociada a la Figura 18 de la concentración de As en la disolución del suelo. Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción Cultivo*Dosis de As. C.s: *C. scoparius*; S.a: *S. atrocinerea*; C.c: *C. cardunculus*; NP: no planta.

ANOVA		Comparación Post-hoc Cultivo*Dosis Tukey al 95%	
		C.c 30	d
Cultivo	< 0,001	S.a 30	d
Dosis	< 0,001	C.s 30	d
Muestreo	n.s	NP 30	d
Cultivo *Dosis	< 0,001	C.c 90	b
Cultivo *Muestreo	n.s	S.a 90	a
Muestreo*Dosis	n.s	C.s 90	c
		NP 90	a

3.1.3 Concentración de As en la extracción secuencial del suelo

La extracción secuencial de elementos traza permite determinar en qué fracciones del suelo se encuentran adsorbidos o retenidos As y metales y qué proporción puede ser más fácilmente intercambiable y movilizable, por lo que este análisis permite hacer una estimación del riesgo que existe de migración de contaminantes a otros compartimentos ambientales, a la cadena trófica o también de la redistribución de los elementos traza entre las distintas fracciones del suelo.

La Figura 19 muestra los porcentajes de As en cada una de las fracciones, referidas en la Tabla 17, con respecto al total extraído (suma de las cinco fracciones), en los dos tratamientos con arsénico añadido (D30 y D90) y en los dos muestreos realizados durante el ensayo, intermedio (INTERM) y final (FIN). La representación de los resultados se ha llevado a cabo con la media de la concentración de As obtenidos en los tiestos con las tres especies vegetales y los sin planta, puesto que el análisis de la varianza mostró que no existieron diferencias significativas entre todos ellos (Variable Cultivo, Tabla 21).

La fracción F1, que representa la proporción de As no específicamente retenida, fue la minoritaria en todos los casos, seguida de la fracción residual F5 y de las fracciones F2, F3 y F4. Esto pone de manifiesto que el arsénico soluble aportado a los suelos se ha redistribuido entre las demás fracciones. Así mismo, el As retenido en la fracción F5 posiblemente se corresponde con la fracción residual del propio suelo control, el cual posee una concentración de As total de $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Ensayo 2 de este capítulo), sin descartar que parte del arseniato añadido haya podido precipitar en formas insolubles no extraíbles fácilmente.

No existieron cambios significativos según el tipo de cultivo en el fraccionamiento de As. Se observaron diferencias significativas en la interacción Fracción*Dosis (Tabla 21). La fracción F2 en la dosis D90 contuvo más proporción de As que la misma fracción en la dosis D30, y en la fracción F4 la proporción de As fue mayor en D30 que en D90. Con respecto a la interacción Fracción*Muestreo, no existen diferencias entre los muestreos INTERM y FIN por fracción, es decir, de un muestreo a otro la proporción de As contenida en cada una de las fracciones no atendió a modificaciones.

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

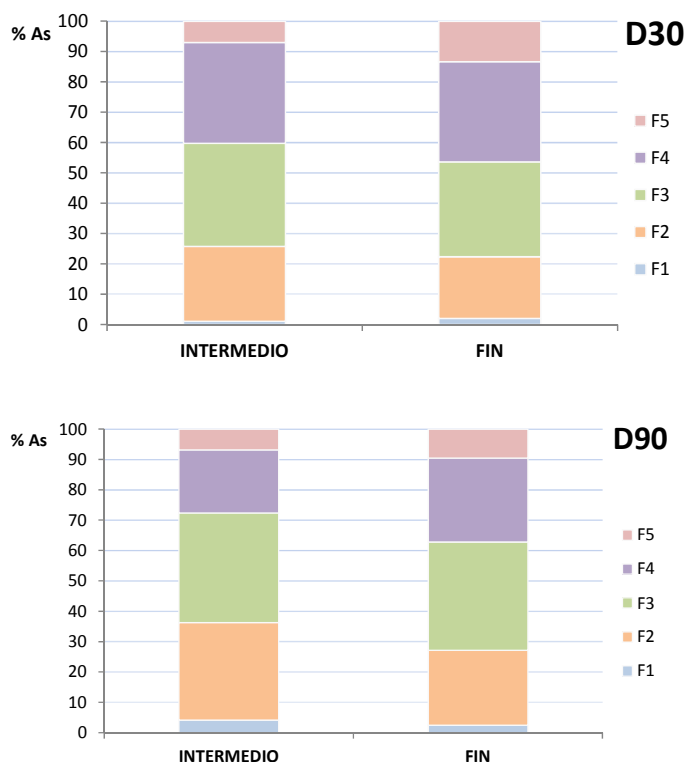


Figura 19. Extracción secuencial de As en los tratamientos D30 (arriba) y D90 (abajo) en los muestreos Intermedio y Final (FIN). Los resultados se muestran en porcentaje de la concentración de As con respecto al total extraído. F1: no específicamente retenido; F2: específicamente retenido; F3: óxidos amorfos de Fe y Al; F4: óxidos cristalinos de Fe y Al; F5: fracción residual.

Tabla 21. Estadística asociada a la Figura 19 del fraccionamiento de As. Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción Fracción*Muestreo y Fracción* Dosis de As,* P<0,01.

ANOVA		Comparación Post-hoc Fracción*Muestreo Tukey al 95%		Comparación Post-hoc Fracción*Dosis Tukey al 95%	
Cultivo	n.s	1 INTERM	f	1 D30	f
Fracción Ext. Sec.	< 0,001	1 FIN	f	1 D90	ef
Dosis	n.s	2 INTERM	cd	2 D30	c
Muestreo	n.s	2 FIN	d	2 D90	b
Cultivo*Dosis	n.s	3 INTERM	a	3 D30	a
Fracción*Dosis	< 0,001	3 FIN	ab	3 D90	a
Fracción*Muestreo	0,005*	4 INTERM	c	4 D30	a
Cultivo*Muestreo	n.s	4 FIN	bc	4 D90	bc
Cultivo*Fracción	n.s	5 INTERM	ef	5 D30	d
Muestreo*Dosis	n.s	5 FIN	e	5 D90	de

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

Para determinar si la planta ha modificado la concentración de As en las fracciones más fácilmente asimilables se han realizado análisis estadísticos similares pero con las concentraciones de As ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en las fracciones F1 y F2 teniendo en cuenta solamente el factor cultivo (Tabla 22). Los resultados muestran que la dosis afecta a la concentración de As, siendo superior en D90 que en D30, mientras que el tipo de cultivo es un factor no significativo, al igual que se observó con el porcentaje. Por tanto, la presencia de plantas no redujo la concentración de As disponible respecto al tratamiento donde no se cultivó.

Tabla 22. Concentración de As ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en las fracciones F1 F2 de la extracción secuencial de As en los tratamientos D30 y D90 y en los muestreos Intermedio (INTERM) y Final (FIN). F1: no específicamente retenido; F2: específicamente retenido. C.s: *C. scoparius*; S.a: *S. atrocinnerea*; C.c: *C. Cardunculus*; NP: no planta. Media \pm ET, n=4. Estadística: La respuesta es la concentración de As en las fracciones F1 y F2 de la extracción secuencial de As.

Concentración de As ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
Cultivo	F1 D30		F2 D30	
	INTERM	FIN	INTERM	FIN
Cc	0,1 \pm 0,04	0,98 \pm 0,00	6,6 \pm 0,07	10,4 \pm 0,1
Sa	0,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,00	6,5 \pm 1,5	5,6 \pm 2,9
Cs	0,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,02	5,7 \pm 0,00	5,0 \pm 0,4
NP	0,8 \pm 0,3	0,03 \pm 0,02	12,7 \pm 2,3	3,4 \pm 0,4
	F1 D90		F2 D90	
	INTERM	FIN	INTERM	FIN
Cc	9,1 \pm 4,6	1,9 \pm 1,2	51,0 \pm 14,2	8,5 \pm 0,00
Sa	2,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,00	28,9 \pm 0,3	33,7 \pm 0,00
Cs	3,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	33,7 \pm 1,5	14,5 \pm 2,3
NP	6,6 \pm 0,7	1,9 \pm 0,05	43,9 \pm 1,0	19,7 \pm 2,4
ANOVA	Interm F1	Fin F1	Interm F2	Fin F2
Dosis	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01
Cultivo	n.s	n.s	n.s	n.s

Se ha realizado un análisis de correlación entre la concentración de As en el muestreo final (muestreo 12) y en las fracciones F1 y F2 de la extracción secuencial en el muestreo final. Solo existió correlación entre la concentración de As de la disolución del suelo y de la Fracción F1 en la dosis D30 (coeficiente de Pearson 0,674, $P<0,05$).

3.2 Planta

3.2.1 Biomasa vegetal

En el trasplante, las tres especies contaban con una cierta cantidad de biomasa, de manera que para la presentación de los resultados se muestra la producción de biomasa (peso fresco) de las especies durante el ensayo (Tabla 23). Para contar con un dato de peso fresco inicial, se seleccionaron plantas de altura y porte similar a la de las plantas que se sometieron a los tratamientos que, una vez pesadas, fueron descartadas.

Tabla 23. Peso fresco de raíz y partes aérea ($\text{g} \cdot \text{tiesto}^{-1}$) al final del ensayo de *C. scoparius* (C.s), *S. atrocinerea* (S.a) y *C. cardunculus* (C.c), $\text{media} \pm \text{ET}$, $n=4$. Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción Especie*Dosis por cada órgano vegetal. * $P<0,01$.

Peso fresco (g)				
	Parte aérea		Raíz	
	D30	D90	D30	D90
S.a	53,8 \pm 2,6 b	41,1 \pm 7,6 b	31,4 \pm 4,1 a	27,8 \pm 4,7 a
C.s	78,5 \pm 5,5 a	44,3 \pm 5,6 b	32,3 \pm 2,0 a	30,7 \pm 7,2 a
C.c	15,4 \pm 2,4 c	19,7 \pm 2,4 c	52,4 \pm 6,1 a	37,5 \pm 14,0 a
ANOVA				
	Parte aérea		Raíz	
Especie	< 0,001		n.s	
Dosis	0,001		n.s	
Especie *Dosis	0,002*		n.s	

Se ha realizado un análisis de la varianza de dos factores para determinar si el efecto sobre el crecimiento vegetal depende tanto de la dosis como de la especie vegetal. Con la dosis D30 se observó que la mayor producción de biomasa de la parte aérea fue la de *C. scoparius* y la menor la de *C. cardunculus*. En raíz no se encontraron diferencias significativas ni entre dosis ni entre especies. Los resultados por tanto muestran que las tres especies presentan una cierta resistencia al aumento de la dosis de As, indicando que, en términos de toxicidad, la biomasa no estuvo afectada. En cambio, en términos de síntomas visuales de toxicidad las plantas de *C. cardunculus* mostraron necrosis en las puntas y bordes de las hojas junto con amarilleamiento de los espacios intervenales y un menor desarrollo radicular de la dosis D30 a la dosis D90

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

(Figura 20). A pesar de ello, es interesante destacar que se registraron valores de peso fresco de la raíz de *C. cardunculus* similares a los de las especies leñosas *S. atrocinerea* y *C. scoparius*.

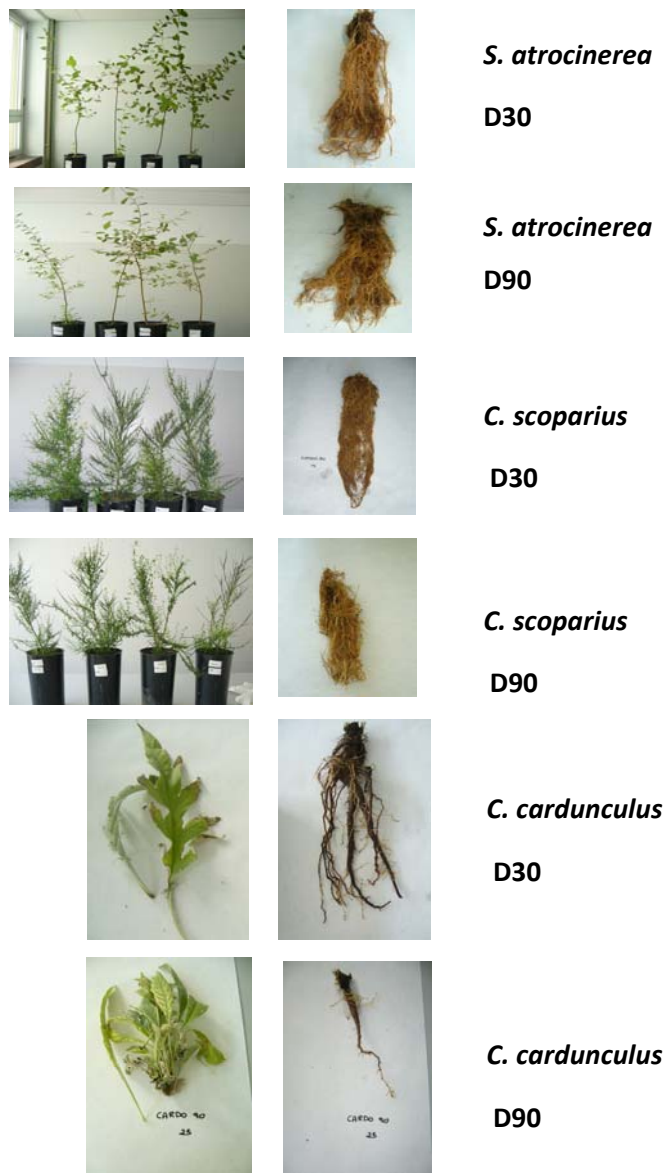


Figura 20. Partes aéreas y raíces de *S. atrocinerea*, *C. scoparius* y *C. cardunculus* al final del ensayo en las dosis D30 y D90 de As.

3.2.2 Concentración y acumulación de As en planta

El análisis de la varianza de dos factores (especie y dosis) indica que existieron diferencias significativas en la concentración de As en cuanto a especie y dosis (Tablas 24).

La concentración de As en *S. atrocinerea* y *C. scoparius* fue superior en raíz que en parte aérea, mientras que en *C. cardunculus* fue al contrario. Los resultados obtenidos en las plantas leñosas coinciden con los de otros ensayos en los que se obtuvo una mayor concentración de As en la raíz que en la parte aérea (Capítulo III.1, Manzano et al., 2013). Aun así, la concentración de As en raíz fue superior en las especies leñosas, pero no con respecto a la parte aérea, donde la mayor concentración de As se encontró en *C. cardunculus*.

Tabla 24. Concentración de As en parte aérea y raíz por planta ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en *C. scoparius* (C.s), *S. atrocinerea* (S.a) y *C. cardunculus* (C.c). Letras diferentes muestran diferencias significativas en la parte aérea en función de la especie por cada dosis de As; y en función de la interacción Especies*Dosis en raíz. Media \pm ET, n=4. Se muestra la relación PA/R ($[\text{As}]_{\text{Parte Aérea}}/[\text{As}]_{\text{Raíz}}$). ** P<0,01.

Concentración de As ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
Parte aérea			Raíz			
	D30	D90	PA/R	D30	D90	PA/R
S.a	2,4 \pm 0,2 b	12,41 \pm 3,7 ab	0,1 \pm 0,06	55,7 \pm 5,8 c	226,4 \pm 25,3 a	0,05 \pm 0,01
C.s	1,7 \pm 0,2 b	7,56 \pm 1,9 b	0,03 \pm 0,002	58,6 \pm 2,0 c	80,4 \pm 12,4 b	0,1 \pm 0,05
C.c	14,3 \pm 0,4 a	22,73 \pm 4,0 a	2,9 \pm 0,3	5,1 \pm 0,7 d	12,0 \pm 3,9 d	2,0 \pm 0,4
ANOVA						
	Parte aérea		Raíz			
Especie	<0,001		<0,001			
Dosis	0,001**		<0,001			
Especie*dosis	n.s		<0,001			

Tabla 25. Acumulación de As en parte aérea y raíz por planta (μg) en *C. scoparius* (C.s), *S. atrocinerea* (S.a) y *C. cardunculus* (C.c). Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción Especie*Dosis por cada órgano vegetal. Media \pm ET, n=4. *P<0,05.

Acumulación de As ($\mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$)				
Parte aérea			Raíz	
	D30	D90	D30	D90
S.a	54,7 \pm 4,7 b	205,0 \pm 41,9 a	346,6 \pm 52,4 b	1117,7 \pm 142,1 a
C.s	41,7 \pm 3,3 b	129,9 \pm 32,8 ab	232,6 \pm 11,4 bc	288,1 \pm 76,1 bc
C.c	80,4 \pm 9,9 b	102,9 \pm 13,2 b	79,2 \pm 22,3 c	107,6 \pm 26,5 bc

ANOVA		
	Parte aérea	Raíz
Especie	n.s	<0,001
Dosis	<0,001	<0,001
Especie*dosis	0,036*	<0,001

En cuanto a la acumulación de As (Tabla 25, $\mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$), el análisis de la varianza de dos factores, especie y dosis, mostraron diferencias en cuanto a dosis, siendo mayor en D90 que en D30, y en cuanto a especie únicamente en raíz, siendo la raíz de *S. atrocinerea* la que más As acumuló. Además, al aumentar la dosis de As, se observó un aumento de la acumulación de As tanto en parte aérea como en raíz de *S. atrocinerea*.

Se determinaron los coeficientes de correlación entre la concentración de As en la parte aérea y raíz de ambas especies vegetales y las encontradas en la Fracción 1 (final) de la extracción secuencial de As para observar la correlación entre ambas variables. No se encontraron coeficientes de correlación significativos y positivos entre ambas variables para las plantas de *S. atrocinerea* y *C. scoparius*, pero sí para *C. cardunculus*. También se realizó con la extracción final de la disolución del suelo (al no haber diferencias significativas entre muestreos). Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Coeficiente R^2 de regresión entre la concentración de As en planta y la concentración de As extraído según dos métodos. *C. scoparius* (C.s), *S. atrocinerea* (S.a) y *C. cardunculus* (C.c). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Coeficientes R^2			
Especie	órgano vegetal	Suelo Fracción 1	Disolución del suelo
S.a	Parte aérea	-0,853**	0,925**
	Raíz	-0,784**	0,927**
C.s	Parte aérea	0,058	0,537*
	Raíz	0,446*	0,111
C.c	Parte aérea	0,601*	0,682*
	Raíz	0,515*	0,990**

Teniendo en cuenta los resultados de biomasa, concentración y acumulación, *S. atrocinerea* es una especie resistente y posee mayor capacidad de acumulación de As que *C. scoparius* y *C. cardunculus*. No se observaron efectos negativos del As sobre la biomasa de *C. scoparius*, pero las dosis añadidas de As no se reflejaron en la acumulación tan claramente como en *S. atrocinerea*. Estos resultados avalan el potencial de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* como especies fitoestabilizadoras de As. En el caso de *C. cardunculus*, sería necesario prolongar su ciclo de cultivo con el fin de observar los efectos de un mayor crecimiento de la parte aérea sobre su capacidad de acumulación de As.

ENSAYO 2. SUELOS MINEROS CONTAMINADOS CON ARSÉNICO Y METALES PESADOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Suelo y planta

El material sólido contaminado proviene de las escombreras de la mina Mónica en Bustarviejo, Madrid. El suelo control, el mismo que en el Ensayo 1 y por tanto no contaminado, se recogió en las inmediaciones de la mina. Tanto el suelo sin contaminar como el escombro se secaron durante una semana al aire y se tamizaron a 4 mm. Al igual que en el caso anterior, cada uno de ellos se homogeneizó utilizando una hormigonera. El ensayo tuvo lugar en el invernadero de la Universidad Autónoma de Madrid bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (el ensayo tuvo lugar durante los meses de febrero a junio: Tª:10-28 °C, humedad: 60-80%)

Se utilizaron dos tratamientos: uno consistió en sólo suelo no contaminado (NC) y otro tratamiento en la mezcla de suelo no contaminado + escombro (NC+E). Ambos tratamientos contenían 1 kg de grava en el fondo (diámetro 3-5 mm). El tratamiento NC se preparó mezclando 3,3 kg de suelo no contaminado más 1,1 kg de la misma grava depositada en el fondo. El tratamiento NC+E se preparó mezclando 1,65 kg de suelo no contaminado más 1,65 kg de escombro más 1,1 kg de grava. Las mezclas se homogeneizaron a mano tiesto por tiesto. Los tiestos utilizados fueron los mismos que en el Ensayo 1 de este Capítulo. En ambos tratamientos se plantaron *S. atrocinerea* (S.a) y *C. scoparius* (C.s) provenientes de un vivero con un año de edad (una planta por tiesto) junto con cuatro tiestos por tratamiento sin planta (NP). La Figura 21 muestra un esquema de los tratamientos que se realizaron, con cuatro repeticiones con y sin planta.

Debajo de los tiestos se colocó un plato donde se recogían los lixiviados, que ascendían al tiesto por capilaridad, proceso facilitado por una tira de tela de algodón incorporada en el interior del tiesto. Los suelos se regaban periódicamente en función de los datos de temperatura y humedad de la cámara del invernadero donde estaban instalados. Se realizaron tres fertilizaciones con 2 g de N (como NH_4NO_3) y 1,2 g de K (K_2SO_4) aplicado en tres momentos: al inicio, después de un mes y de dos meses de iniciarse el cultivo.







n=4	No planta (NP)	S.a	C.s
NC			
NC + E			

Figura 21. Esquema de los tratamientos. NC (no contaminado); NC+E(no contaminado+escombro), S.a (tiestos con *S. atrocinerea*); C.s (tiestos con *C. scoparius*).

Tras cuatro meses de cultivo se procedió al muestreo de suelo y al destructivo de planta. El suelo de cada tiesto se homogeneizó a mano y se recogió una fracción para su análisis. Los suelos se secaron al aire durante una semana y se tamizaron a 2 mm para la realización de las determinaciones analíticas (pH, concentración total y extraíble de arsénico y metales). Los suelos se sometieron a una extracción secuencial de As siguiendo 5 pasos (Tabla 17, Wenzel et al., 2001).

Las plantas se lavaron con agua del grifo y agua destilada. La raíz fue el órgano vegetal que se limpió más detenidamente ante la posibilidad de que las partículas de suelo pudiesen quedar adheridas a las mismas. Se secaron en estufa durante 3 días a 60 °C y se molieron a 0,5 mm para la realización de las determinaciones analíticas. Las muestras se sometieron a una mineralización ácida para analizar arsénico y metales. Se determinaron los factores de Transferencia (FT) y Bioacumulación (FB) de As en raíz y en parte aérea de las dos especies, y la relación PA/R de acuerdo a las siguientes ecuaciones (ET se refiere a cada uno de los elementos traza, As y metales):

$$FT = \frac{\text{Concentración de ET en planta}}{\text{Concentración total de ET en suelo}}$$

$$FB = \frac{\text{Concentración de ET en planta}}{\text{Concentración extraíble de ET en suelo}}$$

$$PA/R = \frac{\text{Concentración de ET en parte aérea}}{\text{Concentración de ET en raíz}}$$

El análisis estadístico de los datos se ha realizado de acuerdo con los métodos estadísticos descritos en M&M, junto con análisis de varianza con más de dos factores.

5. RESULTADOS

5.1 Suelo

En la Tabla 27 se muestra la concentración total de As y metales (Cu, Mn, Zn, Cd y Fe) al final del ensayo en los tratamientos NC y NC+E, y a su vez subdivididos según el tipo de cultivo (sin planta y con planta). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de elemento total entre los tiestos con y sin planta, tanto en NC como en NC+E. La concentración total de As en NC+E fue de media 175 veces superior al límite establecido por la Comunidad de Madrid fijado en $24 \text{ mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$. El tratamiento con el suelo no contaminado también contenía cierta concentración de As, debido a la geología del área de dónde se recogió (próxima a la mina). Aun así, la concentración total de As en NC fue mucho menor que en NC+E. En el caso de los metales, en el tratamiento NC+E la concentración de Cd fue 13 veces superior al límite establecido por la Comunidad de Madrid ($3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), la de Cu 25 veces ($80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), y las de Mn y Zn no superaron sus respectivos límites pero estuvieron cerca de rebasarlo (690 y $11.700 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), sobre todo el Zn, que en los tiestos sin planta llegó a más de $12.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En cuanto a la concentración extraíble de los elementos traza (Tabla 28), existieron diferencias en la interacción Suelo*Cultivo en todos los elementos excepto en Zn y As, este último en la fracción F2 de la extracción secuencial. Se observó una reducción significativa en NC+E de la concentración de As extraíble (fracción F1 de la extracción secuencial) en los suelos con *C. scoparius* en comparación con los sin planta ($P<0,01$). La concentración de Mn extraíble en el tratamiento NC fue mayor que en el tratamiento NC+E a pesar de que la concentración total de Mn en ambos tratamientos no fue significativamente diferente entre ambos suelos. Por esta razón, el coeficiente de correlación entre el Mn extraíble y el total no fue significativo, y de forma similar para Cu y Zn, exceptuando As (concentración en F1) y Cd, cuya concentración extraíble en ambos tratamientos de suelo se correlacionó con la total (r de Pearson: $0,964^{**}$ para As y $0,659^{*}$ para Cd $^{**}P<0,001$; $^{*}P<0,05$). La concentración extraíble de Cd fue muy baja, aunque la total alcanzara valores de hasta $41 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en NC+E.

Los valores de pH del suelo fueron significativamente diferentes entre el tipo de cultivo, pero no con respecto a la variable Suelo ni en la interacción Suelo*Cultivo. En la Tabla 29 se muestra que el cultivo sin planta alcanzó valores de pH más altos que en los tiestos con planta, y que los suelos con *S. atrocinerea* obtuvieron los valores de pH más bajos.

Se ha observado una relación lineal y significativa de dependencia ($P < 0,05$) entre la concentración extraíble de algunos elementos traza y el pH del suelo en el tratamiento NC+E (As, Mn y Cd: 0,614*, -0,603* y -0,589* respectivamente, * $P < 0,05$), pero no en NC. No se ha observado la existencia de una correlación significativa entre la concentración total de elemento y el pH del suelo.

En la extracción secuencial de As (Tabla 30) se observó que en los dos tratamientos de suelo (NC y NC+E) las fracciones 3 y 4 fueron las que más proporción de As retuvieron (óxidos de Fe y Al amorfos y cristalinos), junto con un porcentaje también elevado, pero inferior, en la fracción residual (F5). La proporción de As en las fracciones F1 y F2 fue baja con respecto a las otras fracciones, y no fue significativamente diferente entre suelos cultivados y sin cultivar. Adicionalmente en la Tabla 31 se muestra el porcentaje de metales extraídos con sulfato amónico 0,1 M con respecto a sus totales (Tabla 27). En la tabla se observa que cuanto mayor es la concentración total de metal en el suelo, menor es la proporción extraída.

Tabla 27. Concentración total de As y metales pesados ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) en el suelo no contaminado (NC) y en no contaminado+escombro (NC+E) en los tiestos con y sin planta. No existen diferencias significativas entre tratamientos por cultivo para ningún metal(loide). Media \pm ET, n=4, P<0,05. NP: no planta; S.a: *S. atrocinerea*; C.s: *C. scoparius*.

Concentración total de As y metales pesados ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)							
Suelo	Cultivo	As	Cu	Mn	Zn	Cd	Fe
NC	NP	8,8 \pm 0,3	10,9 \pm 0,3	474,6 \pm 14,7	52,1 \pm 1,3	0,4 \pm 0,02	13990,2 \pm 467,1
	S.a	9,3 \pm 0,3	11,8 \pm 0,2	506,2 \pm 13,0	52,6 \pm 0,7	0,5 \pm 0,07	14827,6 \pm 314,6
	C.s	9,1 \pm 0,2	11,2 \pm 0,1	467,6 \pm 9,5	49,0 \pm 1,3	0,4 \pm 0,04	14038,7 \pm 93,9
NC+E	NP	4166,6 \pm 556,4	2333,2 \pm 200,5	415,4 \pm 15,6	12.618,5 \pm 1309,7	40,3 \pm 3,7	44537,2 \pm 3970,3
	S.a	4142,1 \pm 305,5	2281,3 \pm 83,4	403,9 \pm 9,2	11.851,0 \pm 463,7	40,6 \pm 2,4	48412,9 \pm 799,1
	C.s	3720,6 \pm 245,2	2149,9 \pm 105,5	412,8 \pm 17,9	10.328,6 \pm 473,1	34,8 \pm 2,04	46551,3 \pm 549,6
ANOVA							
	As	Cu	Mn	Zn	Cd	Fe	
Suelo	<0.001	<0.001	n.s	<0.001	<0.001	<0.001	
Cultivo	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
Suelo*Cultivo	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

Tabla 28. Concentración extraíble de metales con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M y concentración de As en la primera y segunda fracción de la extracción secuencial (F1 y F2) ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) en el suelo no contaminado (NC) y en el suelo no contaminado+escombro (NC+E) y en los tiestos con y sin planta. Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción Suelo*Cultivo. Para el As y el Cd el análisis de la varianza solo se ha realizado con la variable Cultivo en NC+E. Media \pm ET, n=4. n.d= por debajo del límite de detección. NP: no planta; S.a: *S. atrocinerea*; C.s: *C. scoparius*. *P<0,05; **P<0,01

Concentración extraíble de As y metales pesados ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)							
Suelo	Cultivo	As F1	As F2	Cu	Mn	Zn	Cd
NC	NP	n.d	0,4 \pm 0,03	0,5 \pm 0,2 b	6,3 \pm 1,9 a	0,4 \pm 0,2 a	n.d
	S.a	n.d	0,3 \pm 0,01	0,8 \pm 0,3 ab	2,4 \pm 0,4 b	0,4 \pm 0,1 a	n.d
	C.s	n.d	0,4 \pm 0,04	2,7 \pm 0,2 a	2,0 \pm 0,1 b	0,8 \pm 0,2 a	n.d
NC+E	NP	9,2 \pm 0,5 a	110,8 \pm 9,3	1,3 \pm 0,5 a	1,0 \pm 0,2 b	0,6 \pm 0,1 a	n.d
	S.a	7,1 \pm 0,7 ab	116,7 \pm 6,2	1,8 \pm 0,8 ab	1,5 \pm 0,2 b	0,4 \pm 0,1 a	0,05 \pm 0,01 a
	C.s	6,0 \pm 0,8 b	116,1 \pm 2,5	0,6 \pm 0,3 ab	0,9 \pm 0,1 b	0,5 \pm 0,04 a	0,05 \pm 0,01 a
ANOVA							
		As F1	As F2	Cu	Mn	Zn	Cd
Suelo		<0,001	<0,001	n.s	0,001**	<0.1	0,004**
Cultivo		0,012**	n.s	n.s	0,030*	n.s	<0,001
Suelo*Cultivo		0,014**	n.s	0,025*	0,021*	n.s	0,002**

Tabla 29. Valores de pH del suelo al final del ensayo. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre cultivos en cada tratamiento de suelo. NC: suelo no contaminado; NC+E: suelo no contaminado+escombro. NP: no planta; S.a: *S. atrocinerea*; C.s: *C. scoparius*. Media \pm ET, n=4.

pH del suelo		
Suelo	Cultivo	pH
NC	No Planta	6,59 \pm 0,04 a
	S.a	5,97 \pm 0,005 c
	C.s	6,29 \pm 0,08 b
NC+E	No Planta	6,61 \pm 0,09 a
	S.a	6,10 \pm 0,10 b
	C.s	6,39 \pm 0,08 ab
ANOVA		
Suelo		n.s
Cultivo		<0,001
Suelo*Cultivo		n.s

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

Tabla 30. Porcentaje (%) de As retenido en las distintas fracciones de la extracción secuencial con respecto al total obtenido mediante la suma de todas las fracciones, en los tratamientos suelo no contaminado (NC) y suelo no contaminado+escombro (NC+E) en los tiestos con y sin planta (NP: no planta; S.a: *S. atrocinerea*; C.s: *C. scoparius*). n.d: por debajo del límite de detección. No existieron diferencias significativas entre cultivos en cada tipo de suelo. Media±ET, n=4.

Porcentaje (%) de As						
Suelo	Cultivo	F1	F2	F3	F4	F5
NC	NP	n.d	5,2±0,38	39,8±4,07	49,5±4,51	5,1±2,34
	S.a	n.d	4,2±0,07	43,6±1,35	45,3±3,01	6,9±2,37
	C.s	n.d	4,5±0,13	40,9±3,88	47,9±2,38	6,6±1,74
NC+E	NP	0,3±0,04	3,4±0,4	41,9±4,1	39,9±4,5	14,5±2,3
	S.a	0,2±0,01	3,0±0,07	45,7±1,3	36,8±3,0	14,3±2,4
	C.s	0,2±0,02	3,2±0,1	51,7±3,9	27,0±2,4	17,9±1,7
ANOVA						
	F1	F2	F3	F4	F5	
Suelo	n.s	<0,05	<0,05	<0,001	<0,001	
Cultivo	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	
Suelo*Cultivo	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	

Tabla 31. Porcentaje de metales extraídos con (NH₄)₂SO₄ 0,1 M con respecto al total (%) en suelo no contaminado (NC) y en suelo no contaminado+escombro (NC+E). Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción Suelo*Cultivo en cada elemento excepto para el Cd. NP: no planta; S.a: *S. atrocinerea*; C.s: *C. scoparius*. Media±ET, n=4, **P<0,01, *P<0,05.

% de metales extraíbles con respecto al total					
		Cu	Mn	Zn	Cd
NC	NP	4,83±1,7 b	1,33±0,4 a	0,7±0,4 ab	-
	S.a	7,09±2,9 b	0,48±0,08 b	0,8±0,2 ab	-
	C.s	23,75±2,5 a	0,43±0,02 b	1,7±0,3 a	-
NC+E	NP	0,054± 0,02 b	0,25± 0,04 b	0,005± 0,001b	-
	S.a	0,080± 0,04 b	0,36± 0,04 a	0,003± 0,001 b	0,12±0,04
	C.s	0,030± 0,02 b	0,22± 0,008 b	0,005± 0,001b	
ANOVA		Cu	Mn	Zn	Cd
Suelo		<0,001	0,004**	<0,001	<0,001
Cultivo		<0,001	0,036*	n.s	n.s
Suelo*Cultivo		<0,001	0,022*	<0,1	n.s

5.2 Planta

5.2.1 Biomasa

Existieron diferencias significativas en la producción de biomasa entre especies (*S. atrocinerea* o *C. scoparius*) y suelos (NC o NC+E) (Tabla 32). De un tratamiento a otro no se observaron cambios en la biomasa de las plantas de *C. scoparius*, mientras que las de *S. atrocinerea* sufrieron una disminución de la biomasa cuando crecieron en el suelo con el escombro en comparación con el suelo no contaminado. A pesar de esta reducción de un tratamiento a otro, la biomasa de *S. atrocinerea* fue mayor que la de *C. scoparius* en todos los casos.

Tabla 32. Producción de biomasa en peso fresco (g) de las raíces y las partes aéreas al final del ensayo de las plantas de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* en el suelo no contaminado (NC) y en el suelo no contaminado+escombro (NC+E), media±ET, n=4. Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción entre Especie*Suelo por órgano vegetal (*P<0,05).

Peso fresco (g)				
Parte aérea		Raíz		
	<i>S. atrocinerea</i>	<i>C. scoparius</i>	<i>S. atrocinerea</i>	<i>C. scoparius</i>
NC	72,0±3,2 a	35,6±2,0 bc	63,5±5,2 a	16,5±0,9 c
NC+E	38,6±3,1 b	25,6±3,8 c	44,3±13,3 b	13,7±1,5 c
ANOVA				
	Parte aérea		Raíz	
Especie	< 0,001		< 0,001	
Suelo	< 0,001		0,014*	
Especie *Suelo	0,002		0,050*	

5.2.2 Concentración de As y metales. Acumulación de As

La concentración de As y metales en los tejidos vegetales de ambas especies, tanto en raíz como en parte aérea, fue mayor en NC+E que en NC, a excepción del Mn, cuya concentración extraíble fue mayor en el suelo control (NC, Tabla 33). También se observó que la concentración de Cu en la parte aérea de *C. scoparius* fue más elevada en el tratamiento NC que en NC+E (la concentración extraíble de Cu en NC también fue más alta).

La concentración de Cd fue superior en los tejidos vegetales de *S. atrocinerea*, con un factor de transferencia igual a 0,8. Teniendo en cuenta que el Cd no es un elemento esencial, como el Mn, cuya relación PA/R fue superior a uno, la movilidad del Cd de la raíz a la parte aérea de *S. atrocinerea* es significativa y útil en programas de remediación mediante fitoextracción. No se observaron diferencias significativas en la absorción de As entre especies, a pesar de haber encontrado diferencias en el cultivo hidropónico con perlita entre *S. atrocinerea* y *C. scoparius* (Capítulo III.1) y en los suelos con As añadido (mayor en raíz de *S. atrocinerea*).

En la Tabla 34 se muestra la acumulación de As y los factores de bioacumulación (FB) y de transferencia (FT) en raíz y parte aérea tal y como se han descrito en Materiales y Métodos. La acumulación de As fue mayor en el tratamiento NC+E ($P < 0,01$), y *S. atrocinerea* la especie que más As acumuló tanto en raíz como en parte aérea. Los factores FT y FB se usan para evaluar la capacidad de transferencia de un elemento traza del suelo a la planta (Huang, 2006). Tanto los FT como los FB fueron del mismo orden entre especies y de valores muy bajos, lo que apunta a la limitación de su absorción por la planta, a pesar de la concentración total de As en el suelo. Como era de esperar, los factores fueron mayores en raíz que en parte aérea, indicando que la raíz es el órgano vegetal que concentra más As y que la transferencia de As de la raíz a la parte aérea estuvo limitada.

Tabla 33. Concentración de As y metales pesados ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en la raíz y parte aérea de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* en suelo no contaminado (NC) y en suelo no contaminado+escombro (NC+E). Letras diferentes muestran diferencias significativas de la concentración de As entre especies por suelo, por órgano vegetal y por elemento. Media \pm ET, n=4. Se muestra el ratio concentración de metal(loide) parte aérea/raíz (PA/R). n.d= por debajo del límite de detección; NP: no planta; S.a: *S. atrocinerea*; C.s: *C. scoparius*.

Concentración de As y metales pesados ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)								
No contaminado (NC)					No contaminado+Escombro (NC+E)			
	Parte aérea		Raíz		Parte aérea		Raíz	
	S.a	C.s	S.a	C.s	S.a	C.s	S.a	C.s
As	0,3 \pm 0,01 a	0,3 \pm 0,1 a	0,5 \pm 0,05 a	0,3 \pm 0,07 b	1,8 \pm 0,3 a	1,0 \pm 0,2 a	54,7 \pm 18,0 a	25,3 \pm 3,3 a
Cu	7,9 \pm 0,8 a	5,1 \pm 1,7 a	17,4 \pm 0,6 a	12,5 \pm 3,9 a	13,4 \pm 4,2 a	1,54 \pm 0,2 b	61,3 \pm 7,7 a	32,5 \pm 1,9 b
Mn	115,0 \pm 8,7 a	86,0 \pm 18,4 a	88,3 \pm 8,3 a	92,7 \pm 12,3 a	96,1 \pm 5,6 a	78,4 \pm 10,1 a	47,9 \pm 5,0 a	45,2 \pm 5,8 a
Zn	48,9 \pm 4,0 a	19,1 \pm 2,03 b	37,4 \pm 3,1 a	34,3 \pm 3,4 a	51,4 \pm 3,4 a	25,2 \pm 3,5 b	154,2 \pm 31,5 a	102,2 \pm 6,4 a
Cd	0,6 \pm 0,03 b	n.d	0,43 \pm 0,07 b	n.d	1,61 \pm 0,2 a	n.d	2,1 \pm 0,4 a	0,09 \pm 0,1 b

ANOVA	As		Cu		Mn		Zn		Cd	
	PA	R	PA	R	PA	R	PA	R	PA	R
Suelo	<0,001	0,001	n.s	<0,001	n.s	<0,001	n.s	<0,001	<0,01	<0,001
Especie	<0,1	<0,1	<0,01	<0,01	n.s	n.s	<0,001	n.s	<0,001	<0,001
Suelo*Especie	n.s	n.s	<0,01	<0,1	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	<0,01

III.2 Ensayos en mesocosmos: suelos contaminados y suelos con arsénico añadido

Tabla 34. Acumulación de As ($\mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$) en la raíz y parte aérea de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* en suelo no contaminado (NC) y suelo no contaminado+escombro (NC+E). Letras diferentes muestran diferencias significativas de la interacción Suelo*Especie por órgano vegetal. Media \pm ET, n=4. S.a: *S. atrocinerea*; C.s: *C. scoparius*. Se muestran los factores de transferencia FB y FT para la parte aérea y raíz en el suelo NC+E.

Especie	Parte aérea		Raíz		FT		FB	
	NC	NC+E	NC	NC+E	PA	R	PA	R
S.a	5,6 \pm 1,7 b	15,4 \pm 2,6 a	14,2 \pm 2,3 c	875,6 \pm 22,6 a	4.3 \cdot 10 ⁻⁴	0,013	0,434	13,2
C.s	1,2 \pm 0,7 b	6,3 \pm 1,7 b	1,9 \pm 0,5 c	134,3 \pm 11,2 b	3,0 \cdot 10 ⁻⁴	0,007	0,205	5,2
ANOVA								
		Parte aérea	Raíz					
Suelo		<0,01	<0,01					
Especie		0,001	0,001					
Suelo*Especie		<0,01	<0,01					

6. DISCUSIÓN GENERAL

Vangrosveld et al. (2009) definieron la fitoestabilización como una estrategia para la estabilización o inactivación de contaminantes potencialmente tóxicos, reduciendo el riesgo de transferencia de contaminantes al medio mediante la disminución de su biodisponibilidad a través del uso de plantas. Otros autores sugieren que, en efecto, es una técnica atractiva, sobre todo para emplazamientos donde la contaminación está confinada en un área limitada, como son las escombreras (King et al., 2008). En este apartado se discutirá si la fitoestabilización no combinada con otras técnicas, para este caso en particular, es aplicable a suelos altamente contaminados, o por el contrario necesita apoyarse en otras técnicas complementarias.

6.1 Concentración de elementos traza en el suelo y en la disolución del suelo. Relación con el pH

Concentración de As en la disolución del suelo

En general, las concentraciones de extractantes químicos que se usan habitualmente en los protocolos de extracción son de mayor fuerza iónica que la que tiene la disolución del suelo, de manera que la desorción de elementos en el primer caso puede distorsionarse sobrestimando la concentración de elemento disponible para una planta (Helgesen y Larsen, 1998). La correlación de la concentración de As entre ambos métodos de extracción sólo se observó en la dosis D30. Otros trabajos ponen de manifiesto la existencia de una correlación robusta entre ambas variables. Por ejemplo con cloruro de calcio en la extracción de Zn, Mn y Cd (Clemente et al., 2012) o con nitrato de sodio en la extracción de Cd (Meers et al., 2007a). Estos trabajos ilustran la efectividad de los dispositivos de succión, indicando su idoneidad para la extracción de la fracción soluble de elementos como varios autores defienden (Dinelli and Lombini, 1996; Meers et al., 2007b, 2007c).

Concentración de As y metales en suelo

Las concentraciones totales de elementos traza en el suelo del Ensayo 2 son similares, e incluso superiores, a las encontradas en otros eventos de contaminación. Debido a la geología del área de estudio, el nivel de As de los suelos contaminados de Bustarviejo es muy elevado. Cabrera et al. (1999) también mostraron la existencia de concentraciones muy elevadas de As

(2800 mg·kg⁻¹) y de Cd, Cu, Mn y Zn (25, 1500, 647 y 700 mg·kg⁻¹ respectivamente) en suelos contaminados por lodo pirítico en Aznalcóllar. En suelos contaminados con un 5% de lodo pirítico procedente de Aznalcóllar, Moreno-Jiménez et al. (2012) hallaron concentraciones del mismo orden que en la mina Mónica de Cd, Cu y Mn y 10 y 30 veces inferiores de As y Zn respectivamente, así como Clemente et al. (2006), que mostraron que los suelos del Corredor Verde del río Guadiamar contenían niveles de As 10 veces inferiores que los de la mina Mónica, argumentando que esos valores ya eran de por sí bastante elevados. El mismo esquema acontece en otros eventos de contaminación (Clemente et al., 2005; Domínguez et al., 2008; Madejón et al., 2010).

Las extracciones secuenciales de As en ambos ensayos ponen de manifiesto que las fracciones dominantes están asociadas a los oxihidróxidos, tanto amorfos como cristalinos, de Fe y Al (la suma de F3+F4 representa entre un 58 y un 70% del total de As en el Ensayo 1, y hasta un 82% en los suelos NC+E y un 89% en NC del total de As en el Ensayo 2). Una buena parte, pero inferior, se encuentra en la fracción residual, sobre todo en el Ensayo 2, siendo mayor en NC+E que en NC, debido a la presencia de los depósitos de arsenopirita y matildita del escombros, que no se encuentran presentes en los suelos control. De esta manera, existe una correlación robusta entre As y Fe total en NC+E (coeficiente de Pearson 0,957*, P<0,05), confirmando que ambos elementos se encuentran formando parte de asociaciones minerales, en este caso con los minerales principales del escombros. Además, la baja extractabilidad de elementos traza refleja el origen del material, en el que la fracción residual actúa como una de las fracciones dominantes (Krysiak y Karczewska, 2007). Por tanto, las fracciones con un menor porcentaje de As retenido fueron las más fácilmente extraíbles, F1 y F2, con lo que la mayor parte del As es poco reactiva (Moreno-Jiménez et al., 2010a; Clemente et al., 2008; Strawn et al., 2002), aunque en el ensayo con As añadido, la fracción F2 es comparable a las siguientes. Teniendo en cuenta que el suelo del Ensayo 1 es el no contaminado del Ensayo 2, una parte del arsénico aportado a los suelos se ha distribuido entre las diferentes fracciones, aumentando el contenido original de As en la fracción F2 (de 0,4±0,02 a 7,0±3,1 en D30 y a 25,2±13,0 en D90 µg·g⁻¹).

La concentración extraíble entre tratamientos (NC y NC+E) de Cu, Mn y Zn fue del mismo orden, aunque para el Mn se observaron mayores diferencias, siendo la concentración de Mn mayor en NC que en NC+E. Otros autores también observaron que la concentración extraíble de determinados elementos en el suelo control superaba a los del suelo contaminado (As, Mn y Cu en Moreno-Jiménez et al., 2012). Como apuntan algunos estudios, la velocidad de intercambio entre las distintas fracciones del suelo parece ser lenta (Cattani et al., 2009) y por tanto el re-

suministro de los elementos desde las fracciones más específicas e insolubles a las más disponibles podría ser un proceso no inmediato. Esto podría suceder en el caso de algunos metales, como por ejemplo en el Zn, a pesar de que la concentración total fuera muy superior en NC+E, más que en NC. Por ello, el porcentaje de extracción de los metales con respecto al total fue inferior en los suelos contaminados que en los no contaminados (Tabla 31). Otros trabajos corroboran los resultados obtenidos. Clemente et al. (2006) mostraron que el As extraíble con EDTA se encontraba en el intervalo 0,11-1,54 %, del mismo orden que en el Ensayo 2 y Alvarenga et al. (2012) registraron porcentajes de As y metales también bajos (As, Cu, Zn y Cd: 2, 0,5, 1 y 4% con respecto al total). González et al. (2006) determinaron que la extracción de Cu, Mn, Zn y Cd con EDTA representó menos del 5% de la concentración de elemento total.

Relación con el pH

Es bien conocida la relación entre pH y la movilización de elementos en el suelo (Madejón et al., 2010; Vázquez et al., 2011). Sin embargo no siempre se obtienen coeficientes robustos de correlación. Clemente et al. (2005) señalaron la falta de dependencia entre Cu y pH, como ocurre en el Ensayo 2, y apuntan a la adsorción de Cu por la materia orgánica. La relación de los elementos traza con las partículas del sue puede conducir a que no exista una correlación entre elementos y pH.

No se observó una correlación entre pH y As en la disolución del suelo. La disminución de pH en los suelos sin planta en la dosis D30 del Ensayo 1 no se tradujo en una disminución significativa de la concentración de As. Tampoco en el Ensayo 2, donde la concentración extraíble de As no se redujo en los suelos con *S. atrocinerea* a pesar de la reducción del pH del suelo al final del ensayo. Todo apunta que el pH no es el único factor influyente sobre el aumento o disminución de la concentración de As.

Se ha documentado que las plantas pueden acidificar la rizosfera, pudiendo llegar a disminuir hasta 2 unidades de pH, debido a la liberación de protones y de ácidos orgánicos por las raíces para movilizar nutrientes, disolviendo fases sólidas que retienen metales (Robinson et al., 2006; Salisbury y Ross, 1978). Se han descrito plantas hiperacumuladoras de Zn que exudan ácidos orgánicos para acidificar la rizosfera e incrementar la absorción de Zn (Luo et al., 2000). Sin embargo, los ácidos orgánicos son mineralizados rápidamente (Do Nascimento et al., 2006), y puede ser debido a ello que no se observen efectos en la modificación del pH. Además no todas las especies liberan ácidos orgánicos cuando necesitan absorber nutrientes. En el campo

sería necesaria una monitorización de una posible acidificación a largo plazo, sobre todo debido a la existencia de depósitos de arsenopirita.

6.2 Biomasa

Es de especial interés la biomasa de *C. cardunculus* durante los primeros estadios del cultivo, donde el desarrollo radicular fue prioritario al de la parte aérea. La biomasa del cardo en raíz fue del mismo orden y estadísticamente similar a la de las plantas leñosas, lo cual es relevante, siendo una planta de menor porte que las especies leñosas. Las plantas de *C. cardunculus* desarrollaron una cantidad de biomasa en raíz superior que en la parte aérea. Sin embargo, *C. cardunculus* es una especie cuya parte aérea puede llegar a elevarse a 3 m de altura y extenderse por una superficie de 1,5 m de diámetro (Fernández et al., 2006). El primer año de cultivo de las plantas de *C. cardunculus* se considera el año de estabilización, en el que las plantas invierten sus recursos sobre todo en el desarrollo del sistema radicular, mientras que durante el segundo año el crecimiento del cultivo es más homogéneo resultando en la expansión de las hojas en forma de roseta (Gominho et al., 2011). Teniendo en cuenta los diferentes estadios morfológicos, el de las plantas de cardo en este capítulo coincide con el momento del desarrollo radicular, el cual tendería a estabilizarse en momentos más avanzados del ensayo a los que no se llegó. Además, se ha descrito que incluso en condiciones extremas, las plantas de *C. cardunculus* pueden sobrevivir y desarrollar todo un sistema radicular capaz de permitir un buen crecimiento de la planta durante los siguientes ciclos de cultivo (Gominho et al., 2011), por lo que no es de extrañar que pese a contaminación de As en el suelo, las plantas hayan sido capaces de mantener el ritmo de crecimiento, al menos durante seis meses de cultivo. En principio el desarrollo vegetal característico del cardo se ha observado en sistemas de cultivo libres de contaminación. Sin embargo, en suelos contaminados como los aquí descritos parece que durante el primer ciclo de cultivo la dinámica es la misma. El mantenimiento del ritmo de producción vegetal es alentador. Es importante sobre todo teniendo en cuenta que la capacidad fitoextractora no puede ser comparable a la de las plantas hiperacumuladoras, por lo que la producción vegetal es primordial ante las limitaciones en este otro sentido.

En general, la reducción de la biomasa es uno de los efectos principales causado por toxicidad de arsénico (Kabata-Pendias, 2010), aunque no siempre se ha documentado así (Chapman et al., 2012), probablemente al no superarse la concentración umbral necesaria para observar alteraciones en el crecimiento. La reducción de la biomasa se puede observar en el Ensayo 1 de una dosis de As a otra. De la dosis D30 a la D90 se observó reducción del crecimiento de la parte aérea de *C. scoparius* con respecto al inicial, pero no en raíz, cuya

biomasa se mantuvo (Tabla 23). En el Ensayo 2 tanto la parte aérea como la raíz de *S. atrocinerea* disminuyeron en los tratamientos con contaminación en comparación con el suelo no contaminado, mientras que las de *C. scoparius* se mantuvo. A pesar de estas reducciones de crecimiento, la producción de biomasa se mantiene en los mismos órdenes de magnitud y por tanto los resultados son satisfactorios. Las limitaciones del tiesto en cuanto a volumen de espacio para la extensión radicular y el contacto directo con el suelo determinaron que tras seis meses de ensayo el crecimiento de la raíz pudiera haber sido limitado, por lo que no se descarta que las raíces pudieran haber crecido más si no fuera por el tamaño del tiesto. Por ello, en el caso de las especies leñosas, el desarrollo de las partes aéreas es más representativo de los efectos causados en el crecimiento vegetal por exposición al As.

6.3 Concentración de As y metales en planta

Las concentraciones de As en las plantas de *S. atrocinerea* y *C. scoparius* tanto en la dosis D30 en el Ensayo 1 como en 2 fueron del mismo orden. Cuando la dosis añadida de As aumentó (D90), la concentración en raíz y parte aérea también lo hizo, aunque no proporcionalmente a la dosis. A pesar de que en otros trabajos se observa que plantas de *C. cardunculus* concentran la mayor parte del As en raíz, (Llugany et al., 2012) en este capítulo se observa que es la parte aérea la que concentró más As y que el factor PA/R fue superior en comparación con el resto de especies. Además, considerando los resultados de acumulación, las tres especies estudiadas sirven como especies indicadoras de la contaminación de As, puesto que tienen capacidad para reflejar en sus tejidos la concentración de elementos en el suelo bajo el que crecen (Madejon et al., 2007), sin olvidar la determinación de la concentración total y disponible de As en el suelo como indicadores de la contaminación de un suelo (Mertens et al., 2005).

La fisiología de las especies leñosas además de limitar la absorción de metales y arsénico, también restringe el transporte de estos a la parte aérea. Por tanto, la concentración de elemento en la parte aérea no siempre es un reflejo de la concentración en raíz (Mertens et al., 2005), y tampoco de la concentración total en suelo (Huang et al., 2006; McLaughlin et al., 2000), pero sí de la concentración extraíble con determinados extractantes. Un incremento de la dosis de elementos puede conducir a un enriquecimiento de las fracciones más solubles y biodisponibles, con lo que la planta debería responder aumentando su absorción y pudiéndola ajustar a una función (Moreno-Jiménez et al., 2010b). Esta relación de dependencia no siempre es lineal, pudiéndose ajustar a otro tipo de funciones, tales como las curvas tipo Michaelis-Menten (Gulz et al., 2005; Moreno-Jiménez, 2010b). En este capítulo, las diferencias existentes

en la absorción de elementos en planta dependen tanto del suelo como de la especie y además la respuesta es diferente entre elementos. Todavía no se conocen especies de plantas que respondan de la misma manera ante un amplio número de elementos (Mertens et al., 2005), esto es, o restringiendo o permitiendo su absorción y/o transporte a tallos y hojas de la misma manera. Esto significa que la predicción de la disponibilidad de elementos en un suelo está sujeta a la especie que crezca en el mismo. La rizosfera puede modificarse mediante la exudación de compuestos que alteren el pH rizosférico y/o la modificación de las condiciones redox que conducen a cambios en la especiación de elementos y por consiguiente afecten a su movilización. Otros factores determinan la absorción, tales como la temperatura, aireación, luz, el tipo del sistema radicular, el tipo de hojas, el tamaño de la planta, etc. (Stankovic et al., 2013).

Un único extractante no representa la fracción disponible de un elemento en cualquier suelo contaminado y bajo cualquier condición (Anawar et al., 2008). Esto ha sido motivo de un extenso estudio sobre la elección de los extractantes para estimar de la forma más fiable la concentración de elemento biodisponible. En la bibliografía se encuentran numerosos trabajos en los que la fracción biodisponible se determina para una especie vegetal en concreto con un determinado extractante (por ej. Gupta y Sinha, 2007 en *B. juncea*). Considerando trabajos previos, la extracción con sulfato amónico en los suelos procedentes de la mina de arsenopirita en Bustarviejo ofreció la mejor correlación suelo-planta (Moreno-Jiménez et al., 2010b). Clemente et al. (2005) encontraron una relación lineal de dependencia entre As total en suelo y As en raíz de *Brassica juncea*; Abbas et al. (2012) con la parte aérea de maíz y el As extraído con bicarbonato de amonio-DTPA; Madejon et al. (2004) también encontraron coeficientes de correlación significativos entre la concentración de As, Cu, Mn, Zn y Cd de las hojas y tallos de *Populus alba* con la concentración de los mismos en suelo superficial extraída con EDTA. Al igual que los anteriores trabajos mencionados, en el Ensayo 1 se determinaron los coeficientes de correlación entre la concentración de As en planta y las encontradas en la fracción más disponible para las plantas, F1 de la extracción secuencial, y la extraída de la disolución del suelo en las dos dosis de As. Por lo general, los coeficientes de correlación suelen ser más elevados para las raíces que para las partes aéreas. La extracción con sulfato amónico fue un indicador pobre de la disponibilidad, pero no así la extracción de la disolución del suelo. La extracción con sulfato amónico puede sobreestimar la concentración de elementos que son fácilmente disponibles para las plantas con respecto a la extraída con las sondas. Los resultados apuntan a que la extracción de la disolución del suelo ofreció correlaciones positivas y significativas con la concentración en planta, por lo que el método puede utilizarse para la determinación de As más fácilmente disponible para las plantas en los suelos de la mina de arsenopirita de Bustarviejo.

En cuanto a la concentración de otros elementos en planta, se encontraron diferencias significativas en la concentración de Cu entre especies únicamente en raíz, indicando que la distribución del Cu en la planta es dependiente de la especie (Madejón et al., 2004). Con respecto al Zn, se ha descrito que las formas solubles de Zn son fácilmente absorbidas por las plantas, y que la absorción es lineal (Kabata-Pendias, 2010). Además, en suelos ácidos y contaminados el Zn se encuentra principalmente en la fracción más móvil seguido de la movilizable (Voegelin et al., 2008), lo cual en los suelos de la mina de Bustarviejo permitiría a una mayor absorción radicular. Aunque la concentración extraíble de Zn haya sido similar en NC y en NC+E, la elevada concentración total de Zn en NC+E determina que el resuministro de Zn a otras fracciones más solubles haya permitido que en las raíces de las plantas que crecieron en estos suelos concentraran más Zn que las del suelo no contaminado.

Los valores de los factores FB y FT no sólo dependen de las especies vegetales, sino también de la concentración de arsénico en el suelo y de su disponibilidad. Cuanto mayor es el contenido total o disponible de un elemento menores son los factores. Estos coeficientes contribuyen a facilitar la comprensión de los resultados en cuanto a la habilidad que tienen las plantas para concentrar As y metales en sus tejidos (Huang et al., 2006). Los suelos en el tratamiento NC+E presentaron concentraciones totales de As y metales elevadas, estando una proporción significativa de As retenida en fracciones no solubles. Como consecuencia, los valores de los FB que están referidos a la concentración disponible de As fueron bajos. Los valores normales de FT en plantas vasculares no son mucho más elevados que los presentados aquí. Por ejemplo en planta leñosas se han encontrado valores de FT de As dentro del intervalo 0,018-0,028 a pesar del alto contenido en arsénico en suelo (Madejón y Lepp, 2007). Klope et al. (1984) determinaron que los valores típicos de transferencia suelo-planta de As se encontraban dentro del intervalo 0,01-0,1. Para las mismas especies estudiadas en este Tesis y en condiciones de campo, los FT de las partes aéreas se correspondieron con 0,019 y 0,0054 en *S. atrocinerea* y *C. scoparius* (Moreno-Jiménez et al., 2010a), mayores que los observados en el Ensayo 1. No sólo la movilización y solubilización de As en los suelos es determinante para que los valores de FB sean bajos. Existen limitaciones fisiológicas específicas de cada especie que restringen la transferencia de As a la parte aérea, a diferencia de otros elementos más móviles dentro de la planta como Cd y Hg (Esteban et al., 2003, 2008). Así, se observa como el FB de As en raíz es superior al FB de As en parte aérea. Son superiores a los FT, debido a que la concentración extraíble es menor que la total, pero a pesar de las diferencias han ofrecido la misma información. Conociendo cual es el factor de transferencia a la parte aérea también podemos conocer el riesgo potencial por la re-circulación de contaminantes desde la planta al suelo o

desde la planta a los herbívoros, sobre todo para las plantas anuales y por la caída de las hojas de los árboles (Mertens et al., 2004).

6.4 Efecto de las plantas sobre concentración de elementos en suelo y pH

La presencia de plantas no tuvo efectos sobre la concentración de elemento total en el Ensayo 2, si bien, el objetivo de la fitoestabilización no es modificar la concentración total, sino provocar cambios en las fracciones más fácilmente extraíbles. Con respecto a estas fracciones, soluble en agua y extraíble con sulfato amónico, se observó que la concentración de As en disolución del suelo del Ensayo 1 y en la extracción de la fracción F1 del ensayo 2 con *C. scoparius* se redujo en comparación con los suelos sin planta, a pesar de que la concentración absorbida por la raíz con *S. atrocinerea* fue superior que en *C. scoparius*. La fracción extraíble de los metales no se modificó entre suelos con planta y sin planta. Otros autores han observado que se puede producir una reducción de las fracciones más fácilmente disponibles de metales, puesto que son micronutrientes y la planta los puede movilizar y absorber (Moreno-Jiménez et al., 2012), aunque no se observó en el Ensayo 2.

Volviendo al As, la reducción de la disponibilidad de As en el tratamientos con *C. scoparius* es un fenómeno alentador pero no concluyente, puesto que en el caso de la disolución del suelo solo se observó la reducción de la concentración de As con la dosis más alta. El análisis de la fracción disponible de As se ha ejecutado en un momento puntual del ensayo para poder hacer una comparación con los otros tratamientos. Sin embargo, la monitorización periódica de las concentración de elementos traza con las sondas de succión aporta información a lo largo del tiempo, aunque también son muestras puntuales pero llevados a cabo de manera continua. Con ellas se pueden analizar posibles cambios en la concentración de elementos siempre que se mantengan entre muestreo y muestreo. Con extracciones periódicas de suelo usando sulfato amónico también se obtendría una información similar, pero la ventaja de las sondas de succión en comparación con la extracción química es que no altera el suelo y la muestra no requiere de mayor preparación, mientras que la extracción supone recoger suelo que no se va a reponer. En los siguientes capítulos en los que se analizan As y metales en columnas de lixiviación se registrarán los datos de concentración de manera continuada, pudiendo determinar al final del ensayo la concentración total lixiviada que podría pasar por el perfil de un suelo. La desventaja que suponen estos dispositivos es que no permiten el cultivo de plantas.

Trabajos previos han incidido en que las prácticas de estabilización de la contaminación con plantas deberían no solo conseguir una manifiesta reducción de la disponibilidad, sino

también una reducción de la concentración total de ese elemento en el suelo (Antosiewicz et al., 2008). Existen muy pocas especies de plantas capaces de llevar a cabo una reducción del contenido total de elemento en el suelo. *Pteris vittata* es una de ellas. Puede reducir la concentración total de As en suelos donde se registró una concentración máxima de As de 196 mg·kg⁻¹ disminuyendo hasta 20 mg·kg⁻¹ de As en un periodo entre 4 y 7 años (Ashwath et al., 2012). Pero este escenario no solo depende de la capacidad de una especie para absorber elementos, sino también de las características físico-químicas del suelo y del re-suministro de elementos desde las fases más insolubles a las solubles, donde sin duda la especie participa modificando el pH o segregando moléculas que ayuden a movilizar elementos. Además, la adaptación, crecimiento, supervivencia y capacidad extractora de As de *P. vittata* está restringida a las condiciones climáticas del medio, propias de climas tropicales o subtropicales (Lessl et al., 2013).

7. CONCLUSIONES

- Las plantas sobrevivieron en los suelos contaminados. En general, la producción de biomasa no estuvo afectada por el aumento de las dosis de As en el ensayo con arsénico añadido, aunque en los suelos contaminados con escombros se observó una reducción significativa de la parte aérea en comparación con el control. Es destacable la producción vegetal de la raíz de las plantas de cardo, superior a la de las plantas leñosas.
- La baja transferencia de contaminantes a la parte aérea las hace aptas para su apoyo en las técnicas de estabilización de la contaminación pero no en fitoextracción. Como caso excepcional, la transferencia de Cd a la parte aérea de *S. atrocinerea* y la de As en *C. cardunculus* es alentadora y requeriría una monitorización de la contaminación más frecuente. La caída del material vegetal incorpora de nuevo los elementos contaminantes al suelo, por lo que la monitorización debería estar centrada en dos épocas del año, entre otoño e invierno coincidiendo con la caída de las hojas de *S. atrocinerea* y al final del ciclo de cultivo de *C. cardunculus*, cuando los frutos maduran y la parte aérea se seca en verano, mientras que la raíz se mantiene viva. Además, en estadios de mayor duración con cardo no se descartan cambios en la absorción de As puesto que el desarrollo se centraría en el desarrollo de la parte aérea.
- El arsénico se encuentra principalmente retenido en las fracciones del suelo asociadas a los óxidos de Fe y Al. La fracción F1 es la minoritaria. Esto implica que el riesgo de migración y movilización vertical y absorción de los contaminantes desde las fases solubles del suelo no tiene un impacto medioambiental tan severo como podría ser el riesgo toxicológico por una posible ingestión del suelo.
- El cultivo de plantas en suelos contaminados, tanto por contaminación natural como añadida, produjo ciertos cambios en las fracciones lábiles de As, sobre todo en los suelos donde se plantó *C. scoparius*. La reducción de la concentración de As de la disolución del suelo en el suelo con arsénico añadido y en la fracción F1 del suelo contaminado con escombros en los tiestos con *C. scoparius* se redujo en comparación con los tiestos sin planta. Estos resultados son prometedores. El apoyo de las técnicas de fitoestabilización asistida con estas especies puede ofrecer mejores resultados en cuanto a la inmovilización de arsénico en el suelo.

7. CONCLUSIONS

- Plant species survived under arsenic and metal exposure. Biomass yield was not affected by the arsenate doses in the spiked assays, although a significant reduction of *S. atrocinerea* shoot yield in soils contaminated with the arsenopyritic residues from the tailings dumps was observed compared to the controls. Interestingly, *Cynara cardunculus* root yield was higher than root yield for the woody plants
- Low transfer coefficients from roots to shoots suggest the selected plant species are unsuitable for phytoextraction but suitable for phytostabilisation. Cd transfer to *S. atrocinerea* shoots and As transfer to *C. cardunculus* shoots is promising, but monitoring is required, in particular during autumn leaf loss for *S. atrocinerea* and at the end of the culture cycle of *C. cardunculus*, when shoots dry out. Changes in As absorption patterns at subsequent growth stages of *C. cardunculus* cannot be ruled out as larger shoot development is expected
- Amorphous hydrous oxide bound fractions and crystalline hydrous oxide bound fractions were the fractions containing higher amounts of As. The non-specific fraction contained the lowest proportion of As. The risk of arsenic migration to other environmental compartments is not as severe as the toxicological risk due to soil ingestion
- Arsenic in pore water and extractable As in pots planted with *Cytisus scoparius* was lower than unplanted pots. These results are interesting in themselves, however, assisted phytostabilisation techniques may help reduce soluble As more efficiently

CAPÍTULO IV

APLICACIÓN DE ENMIENDAS EN SUELOS

CONTAMINADOS

CAPÍTULO IV.1

LIXIVIACIÓN DE ARSÉNICO Y METALES PESADOS EN ENSAYOS CON COLUMNAS

La simulación de la lixiviación natural de los suelos a largo plazo proporciona datos sobre los cambios en las propiedades químicas del suelo que pueden afectar a la movilidad de los contaminantes.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente, en la mayoría de legislaciones se recoge que la concentración total de un elemento en el suelo es la base para la evaluación del riesgo potencial para el medio ambiente derivado de la presencia de metales, metaloides y contaminantes orgánicos. La extracción de las fracciones más solubles del suelo es un procedimiento habitual y útil para la monitorización de la movilidad de elementos traza. Afortunadamente, algunas agencias reguladoras han desarrollado procedimientos estándar que simulan condiciones equivalentes a la lixiviación natural de los suelos y ofrecen una visión mucho más realista que la proporcionada únicamente por la concentración total (Egemen y Yurteri, 1996), dado que la fracción soluble de los contaminantes aporta más información que la total sobre los efectos ecológicos y toxicológicos en el medio (Temminghoff et al., 1998).

Se pueden encontrar protocolos, normas de estandarización ISO y otros protocolos desarrollados por determinados comités acreditados como son los de International Organization for Standardization American Society of Testing and Materials (Eisenberg et al., 1986), Dutch Environmental Agency (NEN 7343, Netherlands Standardization Institute, 1995), Deutsches Institut für Normung, European Committee for Standardisation. Algunos son los siguientes: ISO/TS 21268-1:2007-07; ISO/TS 21268-3:2007-07; CEN 12457-1:2002-04; CEN/TS 14405:2004-06; DIN 19529:2009-01.

El protocolo para el estudio de la lixiviación a largo plazo de elementos contaminantes usado en este capítulo es una modificación del método holandés (NEN 7343, Netherlands Standardization Institute, 1995). El objetivo es obtener datos sobre la lixiviación continuada de arsénico y metales pesados simulando condiciones equivalentes a las reales. Con la

IV.1 Lixiviación de arsénico y metales pesados en ensayos con columnas

incorporación de distintas enmiendas al suelo contaminado, los resultados darán información sobre la efectividad de las mismas y la persistencia de los procesos de inmovilización de elementos traza en el suelo.

Estos ensayos son previos a la experimentación en otros escenarios, que se realizarán con el fin de validar los resultados obtenidos con experimentos donde se introduce el factor planta.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Descripción de las columnas Pharmacia Biotech XK 50/30

Las columnas de lixiviación fueron suministradas por Pharmacia Biotech, GE (Figuras 22 y 23). Son del tipo XK 50/30, de 30 cm de longitud y 5 cm de diámetro interno. Consisten en un tubo interior de borosilicato y otro exterior de material acrílico y con función termostática para permitir el mantenimiento de una temperatura constante en los casos en los que así se desee. La columna está recubierta en sus dos extremos por piezas de plástico acetal reforzado. Las piezas que se enroscan a la columna contienen una malla de nylon de tamaño de poro 10 μm . Al cerrar la columna con estas piezas, esta queda sellada gracias al anillo tipo 'O' presente en cada una de ellas. El adaptador superior contiene un émbolo que permite regular la altura efectiva de la columna. Esta pieza tiene una tubería de 50 cm de longitud y 1,2 mm de diámetro interno y la pieza inferior otra de 30 cm de longitud y 1,2 mm de diámetro interno, las cuales permiten la entrada y salida del fluido. Ambas están protegidas con otras dos tuberías de 5 cm de longitud en la base de las mismas.

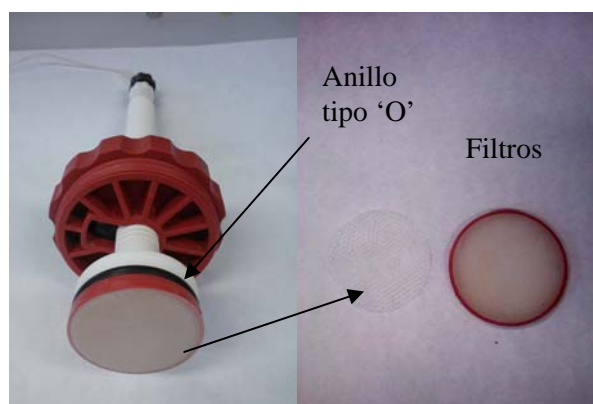


Figura 22. Vista del émbolo superior de las columnas de lixiviación (izq) y filtros interior y exterior del extremo del émbolo (dcha).



Figura 23. Vista de la pieza inferior de las columnas de lixiviación (izq) y columna montada (dcha).

2.2 Procedimiento

Las columnas se rellenaron con 800 g de suelo seco y tamizado a 4 mm, de los cuales, el 40% (en peso) fue material procedente de las escombreras de la mina Mónica (Bustarviejo, Madrid) y el 60% (en peso) suelo control recogido en los alrededores de la mina, en zonas no afectadas por la dispersión de arsénico y metales pesados. El suelo se homogeneizó a mano antes de introducirlo en las columnas y fue mezclado con las enmiendas en las proporciones que se indican a continuación (entre paréntesis se muestra la nomenclatura del tratamiento usada en este capítulo y en el siguiente):

No enmendado ('NE'), utilizado como control

FeSO₄ 1% p/p ('Fe')

CaCO₃ 1% p/p ('Ca')

FeSO₄ 1% p/p + CaCO₃ 1% p/p ('Fe+Ca')

Residuo de papelería 1% p/p ('RP')

FeSO₄ 1% p/p + residuo de papelería 1% p/p ('Fe+RP')

Compost de residuos de poda 3% p/p ('GWC')

FeSO₄ y CaCO₃ fueron suministrados por Sigma Aldrich, el residuo de papelería por la empresa Holmen Paper (Madrid) y el compost por la planta de transformación de residuos vegetales de Migas Calientes (Madrid).

Las columnas se cerraron y se sometieron a un flujo continuo de agua destilada mediante una bomba peristáltica (0,3 mL·min⁻¹) desde la base de la columna hacia arriba para evitar la formación de canales por gravedad. Una vez saturadas las columnas, se recogieron siete fracciones, con dos repeticiones por tratamiento, de manera que al final del ensayo se hizo circular por las columnas un total de 9000 mL de agua destilada (Tabla 35). Cada muestra recogida se filtró (filtro de membrana de tamaño de poro de 0,45 µm) y se almacenó con 0,1% (v/v) de HNO₃ concentrado para su conservación a 4 °C.

Tabla 35. Volumen teórico que pasa a través de las columnas por fracción y volumen acumulado (mL).

Fracción	Volumen	Volumen acumulado
1	90	90
2	90	180
3	270	450
4	450	900
5	900	1800
6	2700	4500
7	4500	9000

2.3 Determinaciones analíticas

En cada una de las fracciones de lixiviado se determinó pH, conductividad eléctrica, arsénico y metales pesados (Cu, Mn, Zn y Fe) mediante los procedimientos descritos en Materiales y Métodos.

En los lixiviados del tratamiento control y 'GWC' además se realizó un análisis de especiación de arsénico y del carbono orgánico disuelto (COD). Los análisis se realizaron en muestras recogidas en el momento en que se muestreaba el volumen acumulado y comenzaba a recogerse la siguiente fracción de lixiviado. Antes de muestrear el volumen acumulado, se recogían 10 mL de lixiviado en tubos. Para el análisis de especiación de As se añadió previamente a los tubos Na-EDTA (para llegar a una concentración final de Na-EDTA en la muestra de 0,5mM) y se congelaron a -4 °C hasta su posterior análisis. El protocolo de especiación se muestra en el apartado de Materiales y Métodos. Para el análisis de COD se tomaron 10 mL de lixiviado en tubos, se filtraron a 0,45 µM y se congelaron a a -4 °C hasta su posterior análisis

Carbono orgánico disuelto (COD)

El carbono orgánico disuelto se calculó mediante la diferencia entre el carbono total (todo el carbono incluido en la muestra, tanto orgánico como inorgánico) y el carbono inorgánico (como iones carbonato, bicarbonato y CO₂ disuelto). Se utilizó un equipo LabTOC (PPM Ltd., UK). El principio de la técnica consiste en la oxidación química mediante radiación UV y persulfato sódico. El carbono total se obtiene mediante la adición a la muestra de ácido fosfórico y el oxidante sodio persulfato expuesto a la luz ultravioleta, que convierte todo el carbono presente en CO₂. Este último se separa de la solución, se seca y la concentración se determina con un

detector de infrarrojos. El carbono inorgánico se determina mediante la acidificación de la muestra con ácido fosfórico y el CO_2 liberado se separa haciendo burbujear N_2 .

2.4 Representación gráfica de los resultados

Se ha calculado la concentración de elementos traza acumulada ($\text{mg ET} \cdot \text{kg}^{-1}$ de suelo). Para ello se multiplica la concentración de ET en cada fracción ($\text{mg ET} \cdot \text{L}^{-1}$) por el volumen recogido de lixiviado en cada una de ellas y se divide entre el peso de suelo presente en la columna. El resultado para cada fracción se suma con los de las fracciones anteriores para obtener el total acumulado. La concentración total acumulada se ha representado frente al volumen acumulado real de agua que ha pasado a través de las columnas. Los gráficos que se muestran son por elemento y por tratamiento con enmienda y control, para poder hacer una comparación entre ambos.

Se ha obtenido una función de ajuste de los puntos representados junto con la ecuación de la función, atendiendo a la significación de los parámetros que la conforman y a la significación global del modelo de ajuste. Con las ecuaciones de las funciones se puede determinar matemáticamente la concentración máxima lixiviada que se ha alcanzado o que se puede alcanzar si se hace circular un determinado volumen de agua a través de las columnas y la cantidad necesaria de agua para que se lixivie la mitad del total acumulado. Estas determinaciones nos permitirían evaluar la tasa de lixiviación. En el apartado 3.5 se explicará con más detalle la interpretación de los parámetros de estas funciones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización del material contaminado

A continuación se muestran varias propiedades físico-químicas de la mezcla suelo no contaminado+escombro, residuo de papelería y compost, así como las concentraciones totales, extraíbles y solubles de As y metales (Tabla 36).

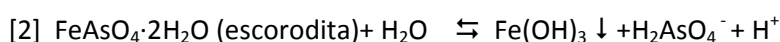
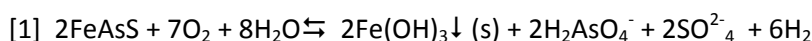
Tabla 36. CE, pH, materia orgánica, textura y concentración total y extraíble de As y metales con sulfato amónico 0,1 M en el suelo no contaminado+escombro y soluble en el residuo de papelería y en el compost. Los resultados de concentración se muestran en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ salvo que se indique lo contrario (media \pm ET, n=4). n.d.: por debajo del límite de detección.

		Suelo no contaminado+escombro (60:40)	Residuo papelería	Compost
pH		4,9 \pm 0,02	7,7 \pm 0,01	7,68 \pm 0,07
M.O. (%)		0,5 \pm 0,05	29,3 \pm 0,40	87,4 \pm 0,5
CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)		37,0 \pm 0,1	253,0 \pm 9,6	2463 \pm 103,3
Textura		Arenosa franca		
% Arcilla		9,0 \pm 0,5		
% Arena		76,5 \pm 0,3		
% Limo		14,6 \pm 0,3		
Elemento total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	As	4437,0 \pm 121,3		
	Cu	891,4 \pm 12,74		
	Zn	3357,0 \pm 27,6		
	Mn	262,9 \pm 11,2		
	Fe (%)	5,3 \pm 0,6		
Elemento extraíble o soluble ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	As	3,0 \pm 0,3	n.d	n.d
	Cu	1,3 \pm 0,06	35,6 \pm 17,4	0,67 \pm 0,05
	Mn	1,6 \pm 0,08	0,2 \pm 0,04	1,65 \pm 0,03
	Zn	6,4 \pm 0,2	n.d	1,20 \pm 0,02
	Fe	8,1 \pm 0,8	n.d	4,06 \pm 0,03

3.2 pH y conductividad eléctrica

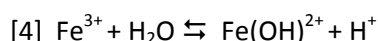
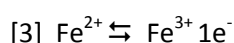
Se ha representado el pH y la CE de cada tratamiento con enmienda en cada una de las fracciones de lixiviado, marcadas en el eje de abscisas, junto con el control sin enmienda para comparar ambos tratamientos. El último de los gráficos de cada Figura (Figuras 24 y 25) se corresponde con todos los valores tanto de pH como de CE de todos los tratamientos juntos.

El pH de los lixiviados del tratamiento control (sin enmienda) fue ácido, debido a la oxidación de la arsenopirita, proceso en el que se liberan protones [1] (Walker et al., 2006). Además, Álvarez-Ayuso y García-Sánchez (2003) observaron que la arsenopirita y la scorodita están íntimamente relacionadas y sugerían que la arsenopirita podía oxidarse directamente a scorodita y ésta liberar arsénico al mismo tiempo que protones y óxidos de hierro que precipitan en el suelo [2]:



Esto explicaría la baja solubilidad del Fe en los suelos control (Figura 32) pese a que el principal mineral encontrado en la escombrera es la arsenopirita.

La incorporación de sulfato ferroso (tratamiento 'Fe') causó una disminución del pH de una unidad de media en comparación con el suelo no enmendado (Figura 24.a). El aporte de sulfato ferroso puede provocar una bajada del pH motivada por la liberación de protones al medio según los equilibrios siguientes (Lindsay, 1979):



En presencia de oxígeno, el Fe(II) se oxida rápidamente a Fe(III) y como se observa en [4], reacciona produciendo protones. A partir de la cuarta fracción de lixiviado en el tratamiento 'Fe' el pH aumentó, correspondiéndose con la disminución de la pendiente de la conductividad eléctrica (Figura 25.a) y con la disminución de la concentración de hierro en los lixiviados de este tratamiento (se observa una meseta en el gráfico, Figura 32.a). El lavado del sulfato ferroso de las columnas junto con la formación de sólidos de Fe que controlan la solubilidad de dicho elemento contribuyó a la subida de pH en los subsiguientes muestreos y a la estabilización de la conductividad eléctrica.

El aporte del residuo de papelera (con un pH medio de $7,7 \pm 0,01$) al FeSO_4 (tratamiento 'Fe+RP', Figura 24.c) incrementó el pH respecto al tratamiento 'Fe' (Figura 24.a) entre un 25 y un 65%. Es destacable mencionar que el pH en 'Fe+RP' aumentó durante el desarrollo del ensayo debido a la disolución de los carbonatos proporcionados por el residuo de papelera (28%) para formar iones hidroxilo (43% de aumento final con respecto a la primera fracción de lixiviado) al mismo tiempo que la CE disminuyó, debido al agotamiento del sulfato de hierro añadido, hasta llegar a estabilizarse en torno a $40 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (del mismo orden que la CE del control sin enmienda).

'Fe+Ca', 'Ca' y 'RP' fueron los tratamientos que contribuyeron a los mayores aumentos del pH de los lixiviados en comparación con el control, entre 3,5-4 unidades de media (Figuras 24. b, d, f). Al igual que en 'Fe+RP', el tratamiento 'Fe+Ca' favoreció el aumento del pH a lo largo del tiempo (20% con respecto al inicio del ensayo). Las otras dos enmiendas, 'Ca' y 'RP' también contribuyeron al aumento del pH final pero en un porcentaje inferior y no significativo (6 y 4% respectivamente). Sin embargo, a pesar de la subida progresiva del pH en 'Fe+Ca', las diferencias en el pH entre este tratamiento y 'Ca' no fueron estadísticamente significativas, siendo menos acusadas en los últimos estadios del ensayo. En ambos se añadió la misma proporción de CaCO_3 (1% p/p), lo que indica que la subida de pH en 'Fe+Ca' estuvo principalmente controlada por la disolución de los carbonatos más que por el lavado del sulfato ferroso. Por otro lado, el tratamiento 'Fe+RP' también posee una proporción considerable de carbonatos, obviamente inferior que el proporcionado por el compuesto puro, por lo que la aportación al aumento de pH fue menor que en los tratamientos donde se añadió carbonato de calcio puro.

La conductividad eléctrica disminuyó en el tiempo en el tratamiento 'Fe+Ca' (Figura 25.b) siguiendo el mismo patrón que los otros tratamientos que incluían sulfato ferroso (Figuras 25.a y 25.c), aunque en 'Fe+Ca' la CE se mantuvo constante y con un valor elevado en las primeras fracciones del ensayo. Posteriormente, las sucesivas fracciones contuvieron menor proporción de sales, indicando que fue en los primeros muestreos donde prácticamente se lixiviaron los iones que proporcionaban una CE más elevada. La CE fue inferior en 'Fe+Ca' que en 'Fe' y 'Fe+RP' y la retención de hierro fue bastante efectiva en el tratamiento 'Fe+Ca' (Figura 32.b), por lo que los aniones sulfato contribuyeron en mayor medida al valor de la CE que los iones ferroso/férrico. Además, la CE del tratamiento 'Ca' no fue significativamente diferente a la del control sin enmienda (Figura 25.d), demostrando que los valores altos de conductividad en 'Fe+Ca' estuvieron controlados inicialmente por el sulfato ferroso más que por el carbonato de calcio. De igual manera sucede con el residuo de papelera en 'Fe+RP'

El aporte de compost ('GWC') contribuyó al incremento del pH en comparación con el control, puesto que se trata de un material de carácter básico, pero lo hizo en menor medida

que las enmiendas encalantes ('Ca', 'Fe+Ca' y 'RP'). El descenso de la CE en el tratamiento 'GWC' transcurrió en paralelo con el del tratamiento sin enmienda, por lo que la dilución del compost en el suelo determinó que la CE fuera significativamente similar a la del control. La salinidad de este compost por si solo es elevada pero similar a otros del mismo tipo (Alvarenga et al., 2007, Tandy et al., 2009). El residuo de papelera posee una conductividad eléctrica inferior a $700 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, el umbral a partir del cual puede existir riesgo por salinidad para las plantas cultivadas sobre sustrato (Cadahía, 2005), por lo que en principio no implicaría toxicidad y tampoco impediría el desarrollo vegetal, mientras que la CE del compost se encuentra por encima implicando un riesgo de ligero a moderado. No obstante, al utilizarlo en las proporciones mencionadas (3% p/p) la salinidad se redujo por debajo de $700 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Las enmiendas que aportaron sulfato ferroso también provocaron el aumento de la CE por encima de este valor, reduciéndose por debajo de $700 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a partir de la fracción 5. En los ensayos con tiestos (Capítulo IV.2), el desarrollo vegetal no estuvo impedido por este parámetro y en comparación con el control fue superior, por lo que se puede asegurar que no dificultó el crecimiento de las plantas, factor a tener en cuenta en los futuros experimentos en campo.

IV.1 Lixiviación de arsénico y metales pesados en ensayos con columnas

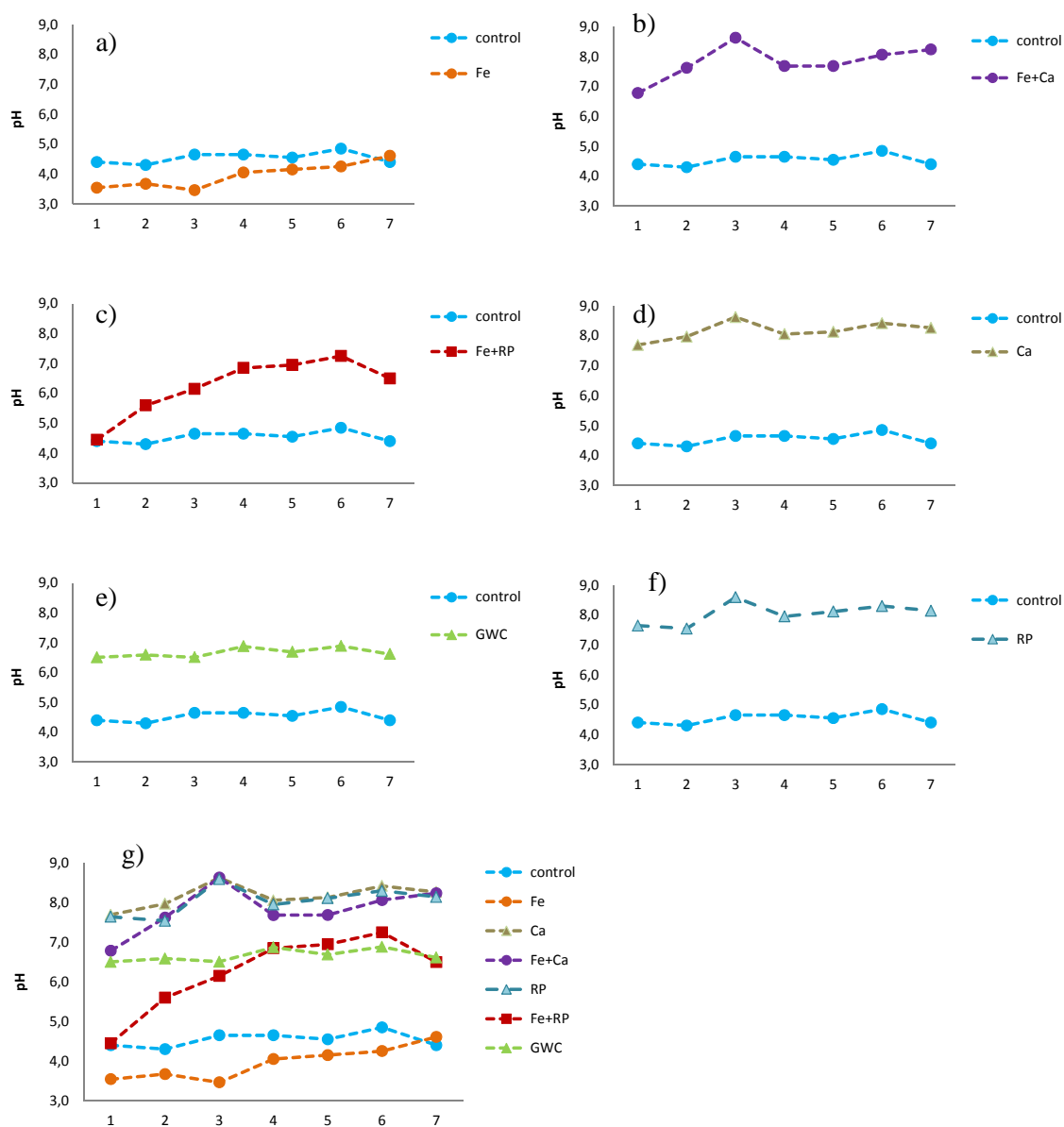


Figura 24. Valores de pH en cada una de las fracciones de lixiviado (a-f). En cada gráfico se muestran los valores de pH del tratamiento control junto con cada tratamiento con enmienda (media, n=2); (g) gráfico de pH donde se muestran todos los tratamientos (media, n=2).

IV.1 Lixiviación de arsénico y metales pesados en ensayos con columnas

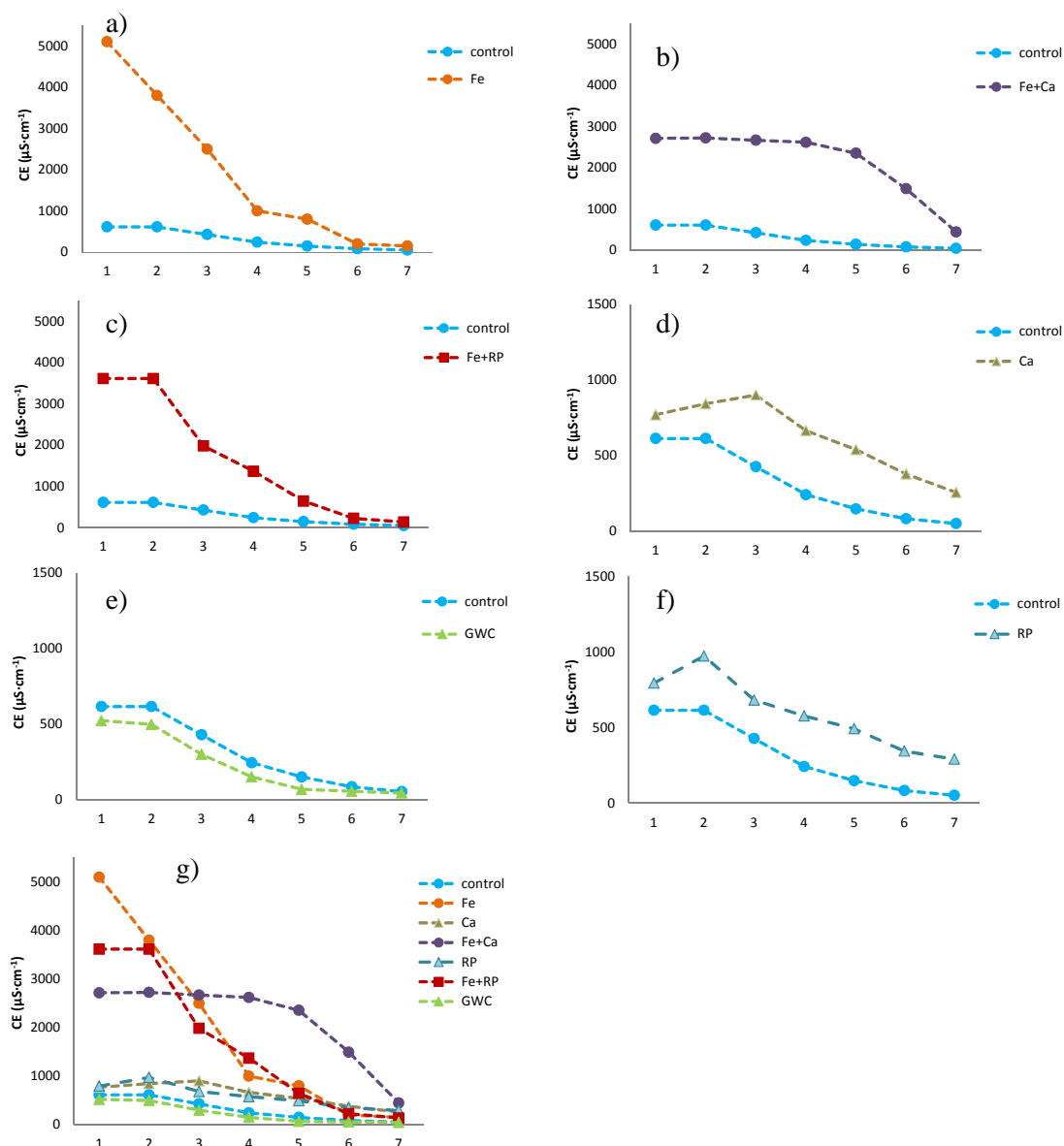


Figura 25. Valores de CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) en cada una de las fracciones de lixiviado (a-f). En cada gráfico se muestran los valores de pH del tratamiento control junto con cada tratamiento con enmienda (media, $n=2$); (g) gráfico de CE donde se muestran todos los tratamientos (media, $n=2$).

3.3 Carbono orgánico disuelto

La concentración de carbono orgánico disuelto fue superior en el tratamiento en el que se añadió compost (Figura 26), como era de esperar y en concordancia con otros autores (Beesley y Marmirolli, 2011; Karami et al., 2011).

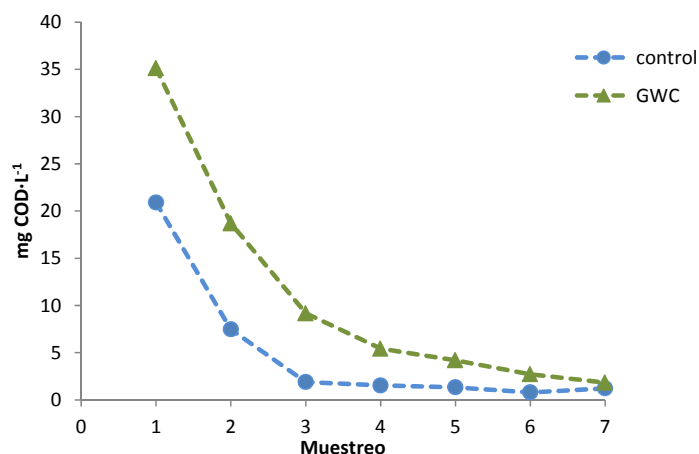


Figura 26. Concentración de carbono orgánico disuelto ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en los lixiviados de los tratamientos control y con compost ('GWC'). media, $n=2$.

3.4 Arsénico y metales en los lixiviados

3.4.1 Arsénico

La lixiviación de As del suelo control está producida por la oxidación de la arsenopirita (ecuaciones [1] y [2]), proceso que en condiciones de campo depende de cambios de las condiciones ambientales, como la meteorización de la arsenopirita y su exposición a la atmosfera oxidante. Como se ha observado en trabajos previos en condiciones de campo en la mina de arsenopirita en Bustarviejo, la concentración extraíble de As es baja pese a la elevada concentración total (Moreno-Jiménez et al., 2010a). En el anterior capítulo se mostró la extracción secuencial de As del mismo suelo (el Capítulo III.2, Tabla 30), en la que se encontró que el As estaba principalmente retenido en las fracciones asociadas a los oxihidróxidos de Fe y Al y a la fracción residual, esto es, formando parte de los minerales presentes, arsenopirita y matildita mayoritariamente, siendo una de las fracciones menos solubles y por tanto la que

aporta menos As a la solución del suelo. En la Tabla 37 se muestran los porcentajes de extracción de metales y arsénico con respecto al total al final del ensayo. Estos proporcionan una estimación de la solubilidad de los elementos analizados. El total acumulado de As extraído de las columnas de lixiviación del tratamiento control representa un 0,02% del As total del suelo, y se corresponde con parte de las fracciones solubles y/o fácilmente extraíbles del suelo. En la extracción secuencial realizada en el anterior capítulo, el porcentaje de extracción de las fracciones F1 y F2 con respecto al total fue más elevado (hasta un 4% del total) que la concentración soluble de As extraída de las columnas, dada la fuerza iónica del sulfato y fosfato amónico que se utilizaron como extractantes.

El éxito de la remediación consiste en reducir la concentración de elementos traza a niveles más aceptables en un tiempo razonable. Mientras que otros programas se centran en el aumento de biodisponibilidad de los contaminantes para ser absorbidos por plantas acumuladoras de arsénico y/o metales, en el emplazamiento de la mina Mónica se propone una reducción de la fracción soluble y de la más fácilmente disponible de elementos traza junto con el establecimiento de una cubierta vegetal. Considerando que no se conocen especies vegetales que respondan ante un amplio número de elementos en términos de acumulación (Mertens et al., 2005), la cubierta vegetal que se propondrá no tendrá una función principalmente extractora (ni en raíz ni en parte aérea). Consecuentemente, para lograr una disminución de la concentración de As lixiviada y en vista del insuficiente potencial de las plantas para reducir de forma manifiesta esta fracción, se propone el aporte de materiales al suelo como apoyo a la fitoestabilización.

Se añadió un aporte adicional de hierro aun teniendo un alto contenido total de Fe original en el suelo. Es bien conocida y está ampliamente documentada la retención de arsénico sobre las superficies de oxihidróxidos de hierro (Fitz y Wenzel, 2002; de Brouwere et al., 2004; Hartley et al., 2004, 2008). Los resultados muestran cómo la concentración acumulada de As en el tratamiento 'Fe' disminuyó sustancialmente, aunque aumentó la de Fe soluble y la de otros elementos (Figura 28.a). Según Woolson et al. (1973), en suelos que contienen más de 0,1% de Fe soluble se pueden formar complejos insolubles Fe-arseniato. Aunque en el tratamiento con FeSO_4 , la concentración soluble de Fe registrada en los lixiviados fue del orden de 10 veces inferior al propuesto por los anteriores autores, es evidente que el arsénico fue retenido en el suelo de forma duradera. La diferencia de los valores de pH entre los tratamientos control y 'Fe' no fue excesiva y en los últimos cuatro muestreos no existieron diferencias significativas entre ambos tratamientos, por lo que se propone que el principal mecanismo que actuó sobre la retención de arsénico en el tratamiento 'Fe' es la neoformación de óxidos e hidróxidos de hierro.

Tras la incorporación de sulfato ferroso al suelo, la formación de Fe(OH)_3 amorfo es muy rápida (en cuestión de minutos) y la formación del llamado Fe(OH)_3 -suelo transcurre en días (Lindsay, 1979), siendo el Fe(OH)_3 del suelo la fase mineral que controlaría principalmente la solubilidad de hierro en los lixiviados. Cabe pensar que la pérdida de Fe soluble del suelo puede actuar en perjuicio de la formación de oxi-hidróxidos. La lixiviación de Fe en el tratamiento 'Fe' aumentó más rápidamente en los primeros muestreos para luego estabilizarse a partir de la cuarta fracción. La pendiente de la curva, bastante elevada, se modificó visiblemente hasta llegar a una meseta, situación en la que la concentración lixiviada de Fe en los sucesivos muestreos fue muy baja o incluso por debajo del límite de detección (Figura 32.a). Sin duda el lavado de Fe de las columnas transcurrió rápidamente. Pero a pesar de ello, la retención de As en el suelo fue estable sin apenas alteraciones, por lo que el aumento de la lixiviación de Fe no perjudicó la formación de nuevos minerales que favorecieran la retención de As. Probablemente esto ha sido posible gracias a que la dosis de sulfato ferroso añadida fue suficiente. Sin embargo, el exceso de Fe que circularía por el perfil del suelo podría suponer un riesgo de contaminación sobre todo para las aguas de los arroyos que circulan por las escombreras (concentración final acumulada de Fe 130 veces más elevada que en el control). Si suponemos que todo el Fe liberado del tratamiento con FeSO_4 procedió del aporte de esta sal, se llegó a lixiviar el 0,96% de Fe del total añadido en el tratamiento 'Fe' y el 3,3 % de Fe del total añadido en el tratamiento 'Fe+RP'. El hierro que se moviliza no es desdeñable en comparación con la situación inicial (control), aunque las concentraciones que se alcanzan en los lixiviados no superaron la concentración máxima permitida de Fe en agua para consumo humano ($200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero). La abundante legislación en materia de aguas (por ej., Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas; Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas) no indica ningún valor umbral de hierro en aguas superficiales que no sean las del consumo humano, por lo se toma el anterior valor mencionado como nivel máximo permitido. La retención de Fe en el perfil del suelo podría estar asegurada a un pH elevado teniendo en cuenta la rapidez con la que se pueden formar nuevos oxihidróxidos de Fe. Además, el rango de pH en el que la solubilidad de Fe es mínima (7,4-8,5), ayudaría a minimizar la movilidad de este elemento.

IV.1 Lixiviación de arsénico y metales pesados en ensayos con columnas

Tabla 37. Proporción de la concentración acumulada de As y metales extraídos en la columnas de lixiviación en cada tratamiento con respecto al total en suelo (antes de la adición de las enmiendas en la mezcla suelo no contaminado+escombro) cuando el volumen que circuló por las columnas fue de 9000 mL. La concentración total de elemento en suelo se expresa $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ salvo que se indique lo contrario.

% extraído en las columnas de lixiviación con respecto a la concentración total de elementos								
	control	'Fe'	'Fe+Ca'	'Fe+RP'	'Ca'	'GWC'	'RP'	Concentración total $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
As	0,02	<0,001	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	$4437,0 \pm 121,3$
Cu	0,03	0,03	0,01	0,002	0,01	0,054	0,01	$891,4 \pm 12,7$
Mn	1,8	4,4	2,5	4,1	0,1	0,3	0,7	$262,9 \pm 11,2$
Zn	0,06	0,1	0,01	0,03	0,02	0,01	0,02	$3357,0 \pm 27,6$
Fe	<0,001	0,2	0,002	0,6	0,002	0,01	0,002	$5,3 \pm 0,6$ (%)

La concentración de As total acumulada en los lixiviados en el tratamiento 'Fe+RP' superó considerablemente a la del tratamiento 'Fe' (Figura 28.a y 28.e) a pesar de que ambos contenían la misma proporción de sulfato ferroso. También se observó un aumento de la concentración acumulada de hierro (3,5 veces más elevada que en el tratamiento 'Fe', Figura 32.c). Con respecto al control, en el tratamiento 'Fe+RP' también se superó ampliamente la concentración de As máxima acumulada final (a 9000 mL de agua circulada por la columna: 5200 frente a 690 $\mu\text{g As}\cdot\text{kg}^{-1}$, Figura 28-e). Sin embargo, a pesar de la creciente lixiviación de As el aporte de la enmienda 'Fe+RP' contribuyó a su retención en las primeras fracciones de lixiviado de forma muy eficaz (Figura 28-e, en la primeras fracciones la concentración acumulada de As fue 140 $\mu\text{g As}\cdot\text{kg}^{-1}$ en el control frente a 24 $\mu\text{g As}\cdot\text{kg}^{-1}$ en 'Fe+RP'). Esto fue así a pesar de que el pH de los lixiviados en 'Fe+RP' fue superior que en el control. El efecto encalante del residuo de papelera, junto con la presencia de Fe soluble en la enmienda, puede contribuir a la precipitación del Fe formando oxihidróxidos y coprecipitando al As, o incluso el As puede aparecer retenido junto a los carbonatos o sulfatos del suelo formando arseniato cálcico (Sadiq, 1997, Domènech et al, 2002). No obstante, el efecto de retención del As proporcionado por el sulfato ferroso fue temporal y la movilización de As pasó a ser controlada por el pH. Esta subida de pH estuvo originada por la lixiviación de las fracciones solubles y/o fácilmente intercambiables de Fe, atendiendo a los equilibrios que estén ocurriendo en el suelo y/o a la precipitación de hidróxidos de Fe y al carbonato de calcio que todavía quedaba sin reaccionar. Se considera que el aumento de la lixiviación de As en 'Fe+RP' puede ocurrir a largo plazo, mientras que a medio/corto plazo

la enmienda sería efectiva como se muestra en la Figura 28.a en las primeras fracciones de lixiviado.

Los tratamientos 'Fe+Ca', 'Ca' y 'RP' fueron los que contribuyeron al mayor aumento del pH de los lixiviados, lo cual favoreció el aumento de la solubilidad del As con el consiguiente incremento de su movilidad. El aporte de materiales encalantes al suelo, además de ser una práctica agrícola muy común que contribuye al aumento de pH del suelo, se ha convertido en un recurso muy eficaz en las tareas de gestión de emplazamientos con metales quedando demostrado que enmiendas como el residuo de remolacha azucarera o los óxidos de calcio reducen la concentraciones extraíbles de ciertos elementos (Alvarenga et al., 2008b). Sin embargo, en el caso del As, la subida de pH contribuyó a su movilización, un efecto no deseable durante el proceso remediador.

La concentración de As acumulada al final del ensayo fue similar en los tres tratamientos encalantes, pero el efecto del tratamiento 'Fe+Ca' durante las primeras fracciones de lixiviado fue más comparable con el del tratamiento 'Fe+RP', aunque la diferencia de una unidad de pH entre los tratamientos 'Fe+RP' y 'Fe+Ca' determinó que para un mismo volumen de agua la movilidad de As fuera mucho más elevada en 'Fe+Ca' que en 'Fe+RP'. La estabilización del pH en valores más elevados desde el momento inicial de la puesta en marcha de las columnas de lixiviación en 'Fe+Ca' propició que las fases minerales de Fe aportaron muy poco Fe soluble a la disolución del suelo (Figura 32.a). La formación de fases sólidas de Fe fue un fenómeno probable, y a corto plazo también se observó que durante las primeras fracciones recogidas el As lixiviado se redujo con respecto al control, aunque este efecto fue de corta duración, puesto que el control de la solubilidad de As estuvo principalmente mantenido por el pH. De esta manera, el porcentaje total acumulado de As con respecto al total del suelo fue superior en 'Fe+Ca' que en 'Fe+RP'. Para ilustrar el diferente comportamiento de As a corto y a largo plazo se realizó un análisis de diferencias de medias de la concentración de As acumulada entre el tratamiento control y los demás tratamientos con enmienda por fracción de lixiviado acumulado. En 'Fe+Ca' y 'Fe+RP' se observaron diferencias significativas entre muestreos excepto en los intermedios (Tabla 38), donde se produjo el punto de inflexión por debajo del que la concentración de As acumulada fue inferior en los tratamientos con enmienda, mientras que por encima la concentración de As superó significativamente a la del control. En los demás tratamientos o existieron diferencias significativas entre todos los muestreos (en 'Fe') o solo al final del ensayo (siendo el control mejor que los tratamientos con enmienda 'Ca', 'RP', 'GWC'). Dado el diferente comportamiento de la lixiviación de As en 'Fe+Ca' y 'Fe+RP' al inicio y al final del ensayo, la lixiviación de As en ambos tratamientos se ajustó a dos funciones exponenciales, para estimar la

IV.1 Lixiviación de arsénico y metales pesados en ensayos con columnas

concentración de As tanto a corto como a largo plazo (Figuras 28e y 28.f). En los otros tratamientos se llevó a cabo un único ajuste exponencial.

Tabla 38. Diferencia de medias por muestreo de la concentración de As entre el tratamiento control y los tratamientos 'Fe+RP' y 'Fe+Ca'. Se muestra la significación del modelo. n.s: no significativo.

Muestreo	'Fe+RP'	'Fe+Ca'
1	<0,01	<0,1
2	<0,01	<0,1
3	<0,05	n.s
4	n.s	n.s
5	n.s	<0,01
6	<0,01	<0,01
7	<0,001	<0,05

El aporte de compost (tratamiento 'GWC') a los suelos no ayudó a la retención de As en el suelo. La interacción entre materiales orgánicos y el As no ha sido siempre propicia para la retención de este elemento. En la bibliografía se encuentra cierta controversia entre los resultados observados. Mientras la retención de As se muestra efectiva en ciertos trabajos, en otros estudios se expone que el aporte de materiales orgánicos favorece la solubilidad y movilidad del arsénico. El porcentaje extraíble de la la concentración total acumulada As con respecto al total en 'GWC' superó considerablemente a la del control, asemejándose a la de los tratamientos 'Ca', 'Fe+Ca' y 'RP' (Tabla 37). La lixiviación de As en el tratamiento 'GWC' podría estar relacionada con varios factores: pH de los lixiviados, COD, Fe soluble y reducción de As(V) a As(III).

Los valores de pH de los lixiviados en el tratamiento 'GWC' (en el rango 6,5-6,9) fueron superiores a los del tratamiento control e inferiores a los registrados en los tratamientos 'Ca', 'Fe+Ca' o 'RP'. Aun así, la concentración extraída de As de las columnas fue comparable a la de los anteriores tratamientos. Por tanto deben existir otros factores que contribuyan al aumento de As en los lixiviados. El carbono orgánico disuelto, al igual que el pH, puede aumentar o disminuir la solubilidad y movilidad de elementos traza (Gräfe y Sparks, 2006; Moreno-Jiménez et al., 2011). Beesley y Dickinson (2009) observaron la existencia de una correlación positiva entre As y carbono orgánico disuelto en el agua intersticial del suelo, determinando que ambos se liberaban conjuntamente. Clemente et al. (2008) atribuyeron el aumento de la solubilidad de As en el agua intersticial del suelo a la del carbono orgánico soluble, a pesar de no encontrar una

correlación sólida entre ambas variables. Sin embargo, la diferencia de la concentración de COD entre el tratamiento control y el 'GWC' no puede explicar totalmente la elevada lixiviación de As en este último.

La presencia de ácidos húmicos también promueve la formación de complejos con el hierro, actuando en menoscabo de la formación de oxihidróxidos y por consiguiente restringiendo la retención de As en la fase sólida (Wang y Mulligan, 2009). Tal como Hartley et al. (2009a) observaron, la incorporación de compost procedente de residuos de poda a suelos contaminados resultaba en una concentración significativamente más elevada de Fe en el agua intersticial del suelo que en los suelos que no recibieron compost. La mayor solubilidad del Fe en el tratamiento 'GWC' que en otros tratamientos ha podido afectar a los mecanismos de desorción/adsorción del As mediante la formación y movilización de complejos arsénico-metal con el COD. Además, moléculas orgánicas de bajo peso molecular cargadas negativamente pueden competir con el arseniato desorbiéndolo de la fase sólida.

Se realizó el análisis de las especies de As en los lixiviados del control y del tratamiento 'GWC'. Se muestran los resultados en porcentaje de especies de arsénico, As(V) y As(III), con respecto al total de las especies de As encontradas en cada muestra (Figura 27). Los resultados del tratamiento control revelaron porcentajes equivalentes de As(III) y As(V) en los primeros muestreos de la lixiviación, pero a medida que avanzaba el experimento el porcentaje de As(V) llegó hasta el 100% reduciendo la fracción de As(III) considerablemente hasta niveles por debajo del límite de detección. En el tratamiento 'GWC' se observó la tendencia contraria, de manera que la proporción de As(III) fue aumentando en el tiempo mientras que la de As(V) disminuyó significativamente. No se encontraron otras especies de As, como las orgánicas MMA o DMA, ni en el control ni en el tratamiento 'GWC'. La mayor movilidad del As(III) en suelos y lixiviados con valores de pH como los que se presentan en estos ensayos podría explicar este incremento en la lixiviación de arsénico para el tratamiento 'GWC', puesto que el arsenito se presenta sin carga. Estos resultados ponen de manifiesto que el aporte de materiales orgánicos puede provocar la reducción de As(V) a As(III). La reducción se lleva a cabo a través de reacciones en las que intervienen microorganismos, y son reacciones en las que se el As(V) actúa como aceptor final de electrones de la oxidación de la materia orgánica durante la respiración anaeróbica (Dowdle et al., 1996). La reducción de As(V) a As(III) mediada por microorganismos también puede ocurrir bajo condiciones aerobias y de manera relativamente rápida (Macur et al., 2001). La creación de un medio reductor en el tratamiento control no fue probable ante los resultados de especiación de arsénico, por lo que la reducción del arseniato a arsenito en el tratamiento 'GWC' ocurrió debido al aporte del material orgánico y la posible disminución del potencial redox no fue debida

IV.1 Lixiviación de arsénico y metales pesados en ensayos con columnas

a factores físicos como podría ser el agotamiento de oxígeno de las columnas por encharcamiento de las mismas.

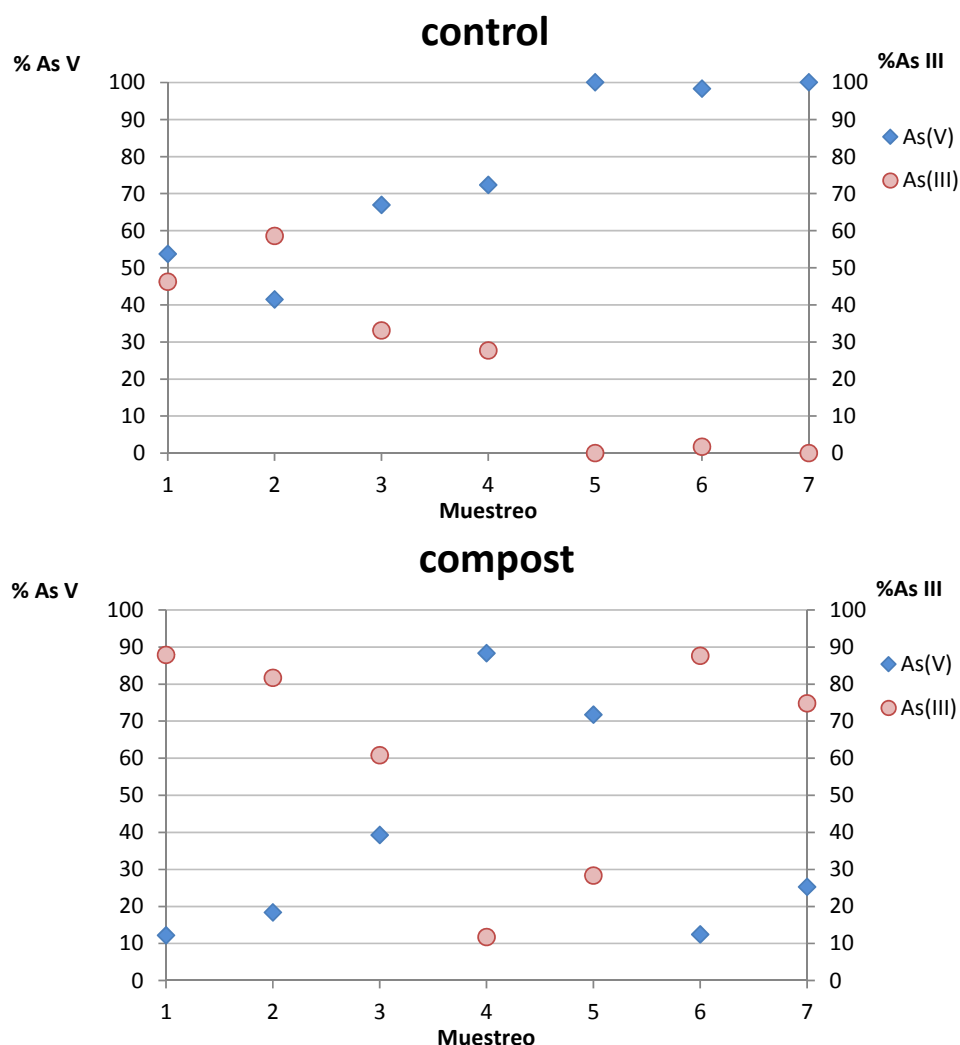


Figura 27. Porcentajes de As(V) y As (III) con respecto al total de las especies analizadas en cada uno de los muestreos del tratamiento control (arriba) y el tratamiento con compost 'GWC' (abajo). El eje de la izquierda en ambos gráficos muestra el porcentaje de As(V) y el de la derecha el porcentaje de As(III) con respecto al total de las especies de As encontradas (media, n=2).

3.4.2 Metales

Solubilidad de los elementos traza analizados

Considerando solamente el tratamiento control, el Mn fue el elemento más móvil de entre todos los analizados, a pesar de que la concentración total de Mn en el suelo fue la más baja (Tabla 37). El menos móvil de todos ellos fue el Fe, seguido de Cu y Zn. Esta observación se realiza a partir de los datos obtenidos del tratamiento control, puesto que la incorporación de enmiendas modificó el comportamiento de todos los elementos traza.

Efecto de las enmiendas con sulfato ferroso sobre los elementos traza

El tratamiento 'Fe' movilizó en gran medida Mn y Zn en comparación con el control (70% de aumento en ambos elementos, Figuras 9.a y 10.a). Los otros dos tratamientos con sulfato ferroso ('Fe+Ca' y 'Fe+RP') redujeron la extracción de Zn con respecto al control posiblemente por la subida de pH (Figuras 10.b y 10.c), pero no la del Mn, que fue mayor en 'Fe+Ca' y en 'Fe+RP' en comparación con el control (Figuras 9.b y 9.c). La lixiviación de Cu no estuvo afectada por el tratamiento 'Fe' pero sí por 'Fe+Ca' y 'Fe+RP', los cuales favorecieron la reducción de su lixiviación.

Efecto de las demás enmiendas sobre los elementos traza

El contenido inicial de metales en el compost pudo haber afectado a su lixiviación con respecto al control. Para ello se determinó la concentración extraíble de As y metales al inicio del ensayo antes de introducir el material en las columnas (suelo no contaminado + escombro + enmienda) y al final tras el desmontaje de estas (Tabla 39). Se puede observar la tendencia registrada en las columnas. Al final del ensayo la concentración de Mn y Zn se redujo con respecto al control, a pesar de que la concentración inicial de Mn fue superior a la del control. La concentración de Zn también disminuyó considerablemente al final en 'GWC' a pesar de que la concentración inicial fue similar a la del control. El mismo procedimiento se realizó en los tratamientos 'Fe+RP' y 'RP'. En el tratamiento 'Fe+RP' el cambio más significativo se observa sobre la concentración de As extraíble final en comparación con la inicial. El tratamiento 'RP' inicialmente aportó sobre todo Cu a la mezcla inicial de suelo no contaminado+escombro, aunque al final los resultados también se pueden correlacionar con los de los lixiviados al encontrar una concentración extraíble más baja de Cu y Mn en 'RP' que en el control. Al igual que en 'GWC' el comportamiento de estos elementos atiende a la interacción de los mismos con

IV.1 Lixiviación de arsénico y metales pesados en ensayos con columnas

las enmiendas durante todo el ensayo y no exclusivamente a la contribución al contenido inicial de elementos en la mezcla suelo+escombro.

Tabla 39. Concentración de As y metales extraíbles con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, en el tratamiento control, en 'GWC', 'Fe+RP' y 'RP' al inicio y al final del ensayo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cada tratamiento con enmienda (GWC, Fe+RP o RP) con el control en cada muestreo (inicial y final) y por elemento analizado. n.d: por debajo del límite de detección. $P<0,05$.

	Control	'GWC'	'Fe+RP'	'RP'
Inicial				
As	2,9±0,1 a	3,4±0,2 a	0,02±0,01 b	0,4±0,03 b
Cu	1,5±0,03 b	0,33±0,02 b	0,2±0,2 b	28,4±6,4 a
Mn	7,6±0,01 b	36,54±0,9 a	30,9±0,5 a	7,0±0,2 b
Zn	7,7±0,2 a	5,40±0,23 b	1,2±0,9 b	0,5±0,02 b
Fe	n.d	1,79±0,13	52,9±47,7	n.d
Final				
As	6,3±2,1 a	7,4±0,3 a	7,5±0,31a	0,8±0,1b
Cu	2,4±0,3 a	0,20±0,02 b	0,3±0,3 b	1,8±0,3 b
Mn	14,6±5,3 a	5,04±0,38 b	10,1±0,1 a	1,8±0,3 b
Zn	8,9±0,6 a	0,73±0,10 b	1,1±0,1 b	0,3±0,2 b
Fe	n.d	1,85±0,61	0,2±0,2	6,1±4,3

Cuando se añade un material orgánico es posible la redistribución de elementos entre las distintas fracciones del suelo, de manera que tras su aplicación, la proporción de elementos asociada a fracciones tales como la intercambiable, soluble en ácido y asociada a óxidos de Fe y Al, puede disminuir en beneficio de la fracción asociada a la materia orgánica (Pérez-Esteban et al., 2013). Se ha descrito la co-movilidad del carbono orgánico disuelto, además de con el As, con el Cu y el Zn en muestras del agua intersticial del suelo (Clemente et al., 2008; Sneddon et al., 2009; Beesley et al., 2010b). En este trabajo se observa que la lixiviación de Cu en 'GWC' solo aumentó en las etapas finales del ensayo, y la de Zn se redujo con el aporte de compost. La disponibilidad de Zn puede disminuir en suelos con materiales orgánicos debido a la formación de compuestos órgano-metálicos insolubles (Adriano, 2001). Dependiendo del grado de humificación de la materia orgánica, la presencia de ácidos orgánicos de bajo o alto peso molecular, con mayor o menor solubilidad respectivamente, afectará a la movilidad de los elementos (Kumpiene et al., 2008). El efecto del pH también pudo haber afectada a la reducción de Zn en 'GWC' por el aumento de la presencia de cargas negativas del compost sobre las que

podría quedar adsorbido, como consideran otros autores (Hartley et al., 2010). Además, el Zn es un elemento relativamente insoluble a partir de pH 7 (Ross, 1994), por lo que el pH también puede haber contribuido a la retención del Zn. Con respecto al Cu, la incorporación de materiales orgánicos puede favorecer a la reducción de Cu de las fracciones solubles del suelo (Karami et al., 2011) mientras que en otros trabajos se observa que el aporte de otros materiales orgánicos contribuye a un aumento de la solubilidad de Cu en la solución del suelo. En nuestro caso, el aumento de la lixiviación de Cu no es inmediato, como se describe en otros trabajos (Beesley et al., 2010b), pero sin embargo comienza a diferenciarse del control a medida que avanza el experimento. Bloom (1981) estableció el siguiente orden en cuanto afinidad de metales divalentes por ácidos húmicos: $Cu > Pb >> Fe > Zn > Mn$, de manera que una posible explicación del aumento de Cu soluble es la formación de complejos solubles con la materia orgánica.

El Mn en suelos de pH ácido generalmente se encuentra presente en las fracciones solubles e intercambiables (tanto orgánicas como inorgánicas), mientras que en suelos con un pH más elevado el Mn se encuentra en formas fácilmente reducibles (óxidos de Mn) (Adriano et al., 2001). Sin embargo, los cambios en el pH no parece que hayan sido el factor determinante del comportamiento del Mn. En los tres tratamientos donde se aportó sulfato ferroso, el Mn soluble aumentó a pesar de que el pH de los lixiviados fue diferente entre esos tratamientos. Así, la concentración máxima acumulada de Mn llegó a ser similar en los tres (pH ácido en 'Fe', básico en 'Fe+Ca' y cercano a la neutralidad en 'Fe+RP'). El Fe soluble es otro de los factores a tener en cuenta. En el tratamiento 'Fe+Ca', el aumento de pH provocó la disminución de la solubilidad de Fe en comparación con los tratamientos 'Fe+RP' y 'Fe'. La competencia Fe/Mn por las posiciones de cambio del suelo puede haber contribuido a la liberación de Mn en 'Fe+Ca', donde el pH debería haber favorecido la precipitación de Mn en forma de óxidos de Mn(III) y Mn(IV). Con respecto al tratamiento 'GWC', la complejación con la materia orgánica parece ser un factor importante en la reducción de la solubilidad de Mn en el tratamiento 'GWC', disminuyendo por debajo del control y de los otros tratamientos, aunque es uno de los elementos con menor afinidad por la materia orgánica.

Los tratamientos 'Ca' y 'RP' fueron las enmiendas que consiguieron homogeneizar de manera general los comportamientos de los tres metales, aunque como se explicará en el apartado 4, el tipo y ritmo de lixiviación difiere entre tratamientos y entre elementos. En estos dos tratamientos 'Ca' y 'RP', en los que los valores de pH fueron similares a los de 'Fe+Ca' y no se aportó sulfato ferroso, la solubilidad de todos los metales divalentes estuvo controlada principalmente por el pH.

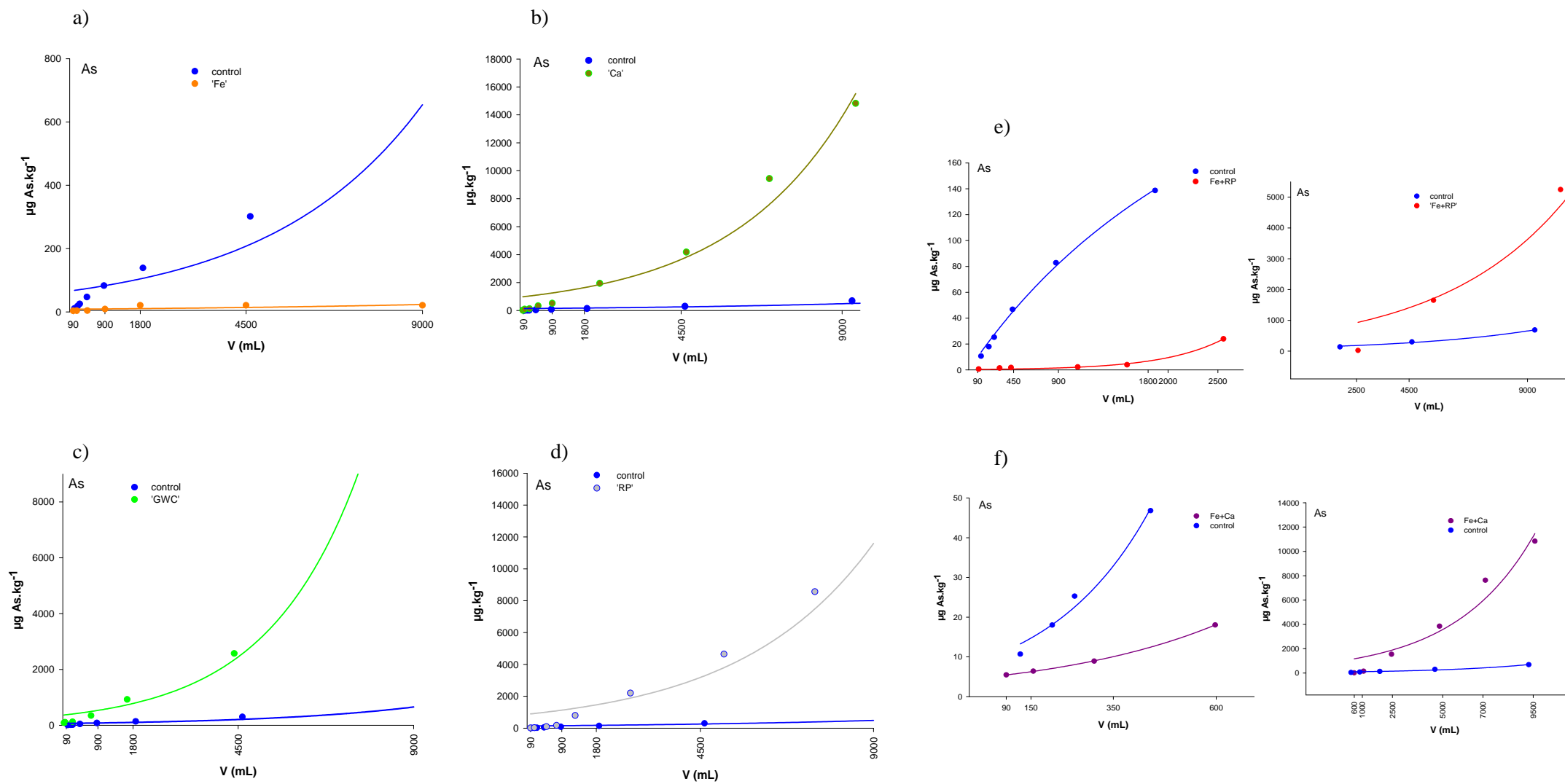


Figura 28. Concentración acumulada de Au ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) en los lixiviados de todos los tratamientos junto con el control: a) 'Fe'; b) 'Fe+Ca'; c)'Fe+RP'; d)'Ca'; e) 'GWC'; f) 'RP'.

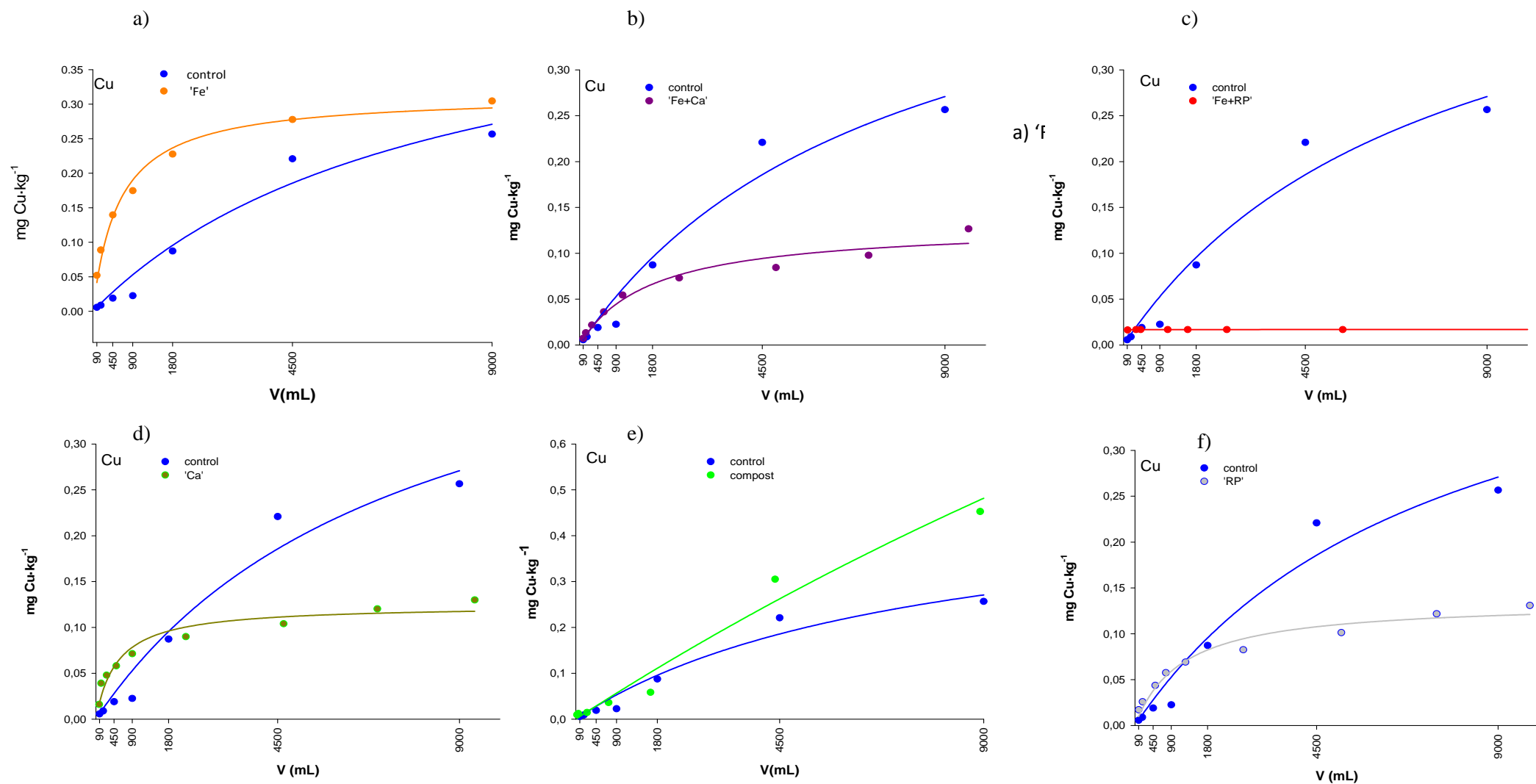


Figura 29. Concentración acumulada de Cu (mg·kg⁻¹) en los lixiviados de todos los tratamientos junto con el control: a) 'Fe'; b) 'Fe+Ca'; c) 'Fe+RP'; d) 'Ca'; e) 'GWC'; f) 'RP'

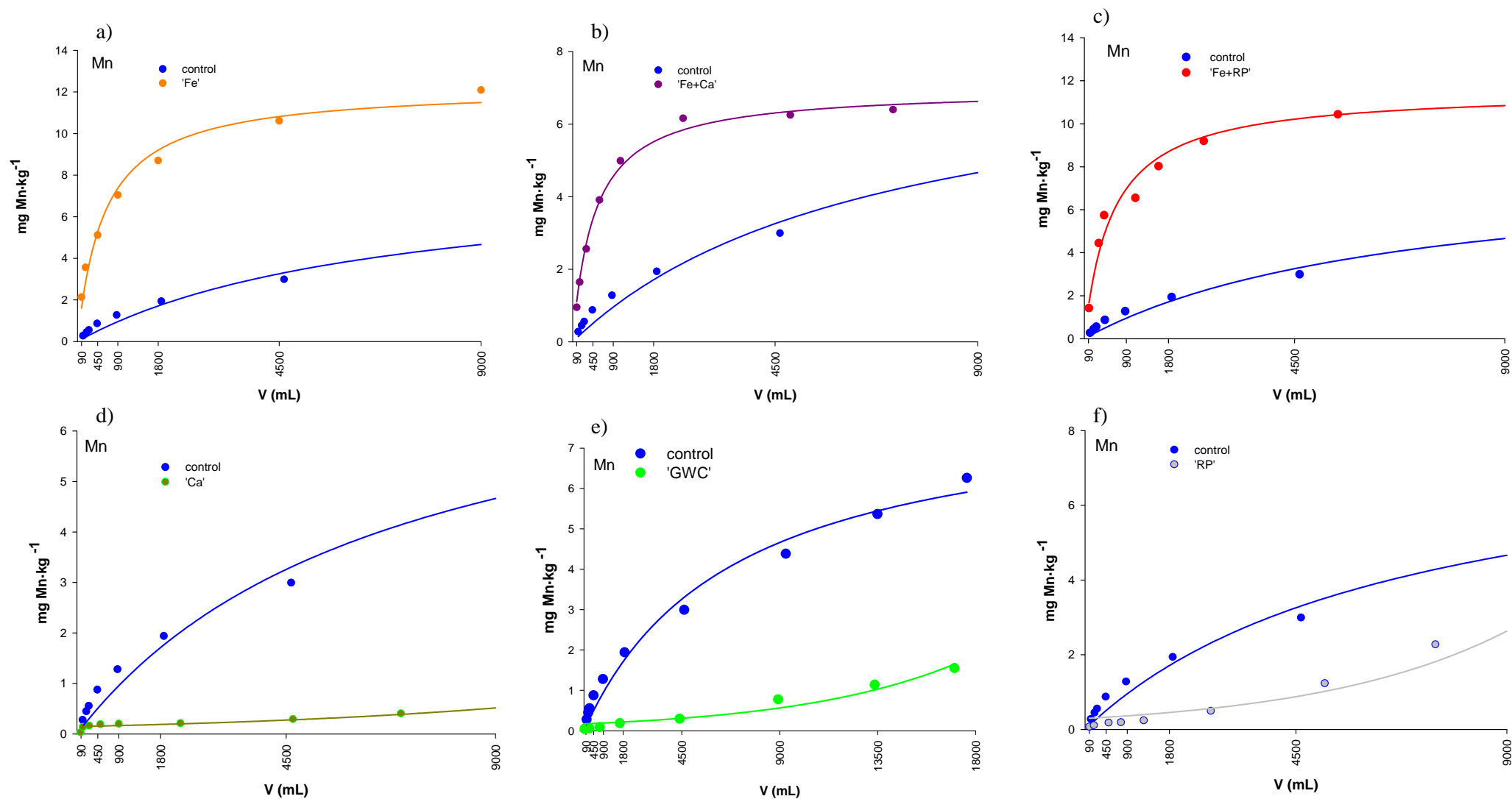


Figura 30. Concentración acumulada de Mn (mg·kg⁻¹) en los lixiviados de todos los tratamientos junto con el control: a) 'Fe'; b) 'Fe+Ca'; c) 'Fe+RP'; d) 'Ca'; e) 'GWC'; f) 'RP'

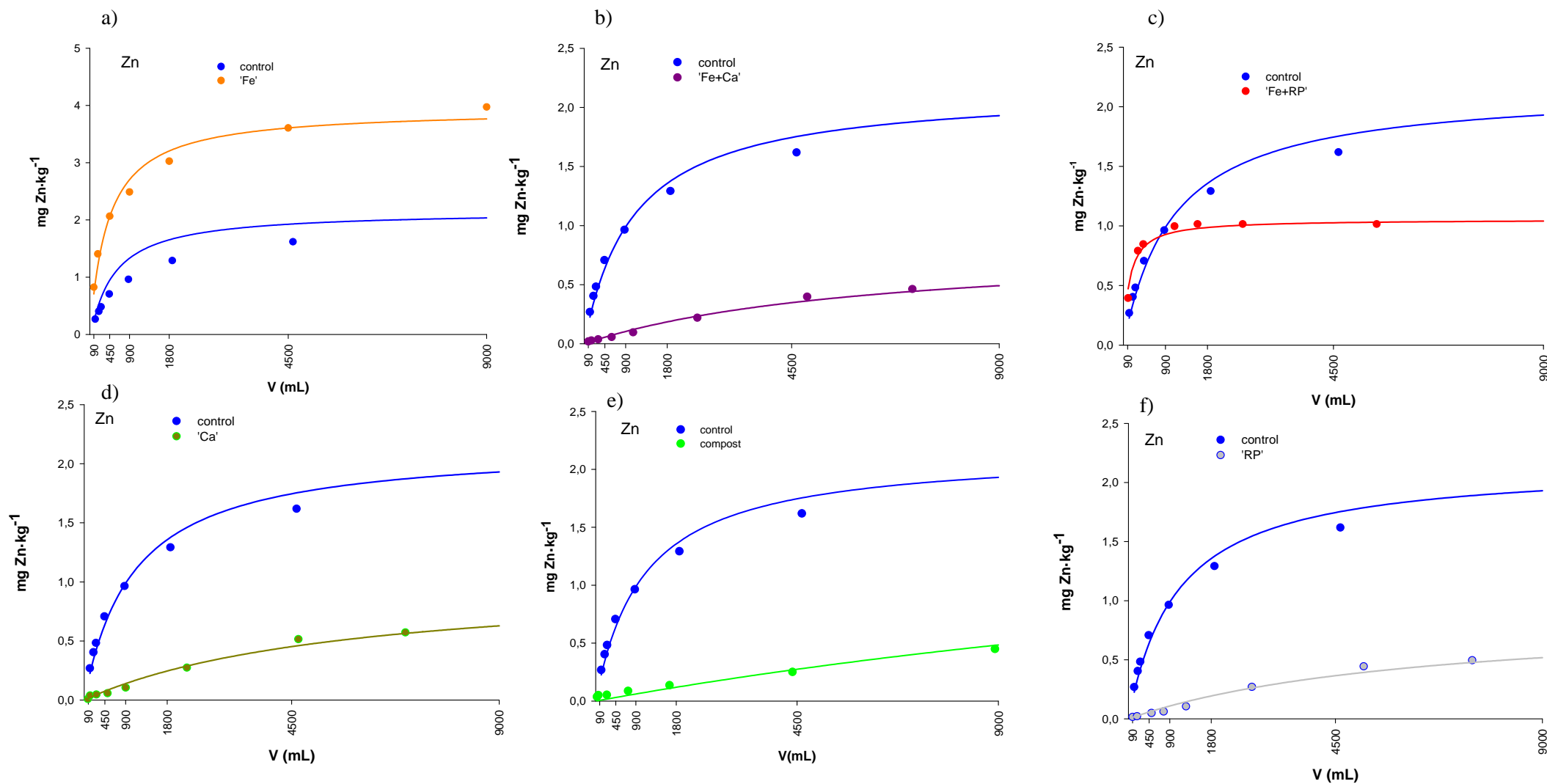


Figura 31. Concentración acumulada de Zn (mg·kg⁻¹) en los lixiviados de todos los tratamientos junto con el control: a) 'Fe'; b) 'Fe+Ca'; c) 'Fe+RP'; d) 'Ca'; e) 'GWC'; f) 'RP'

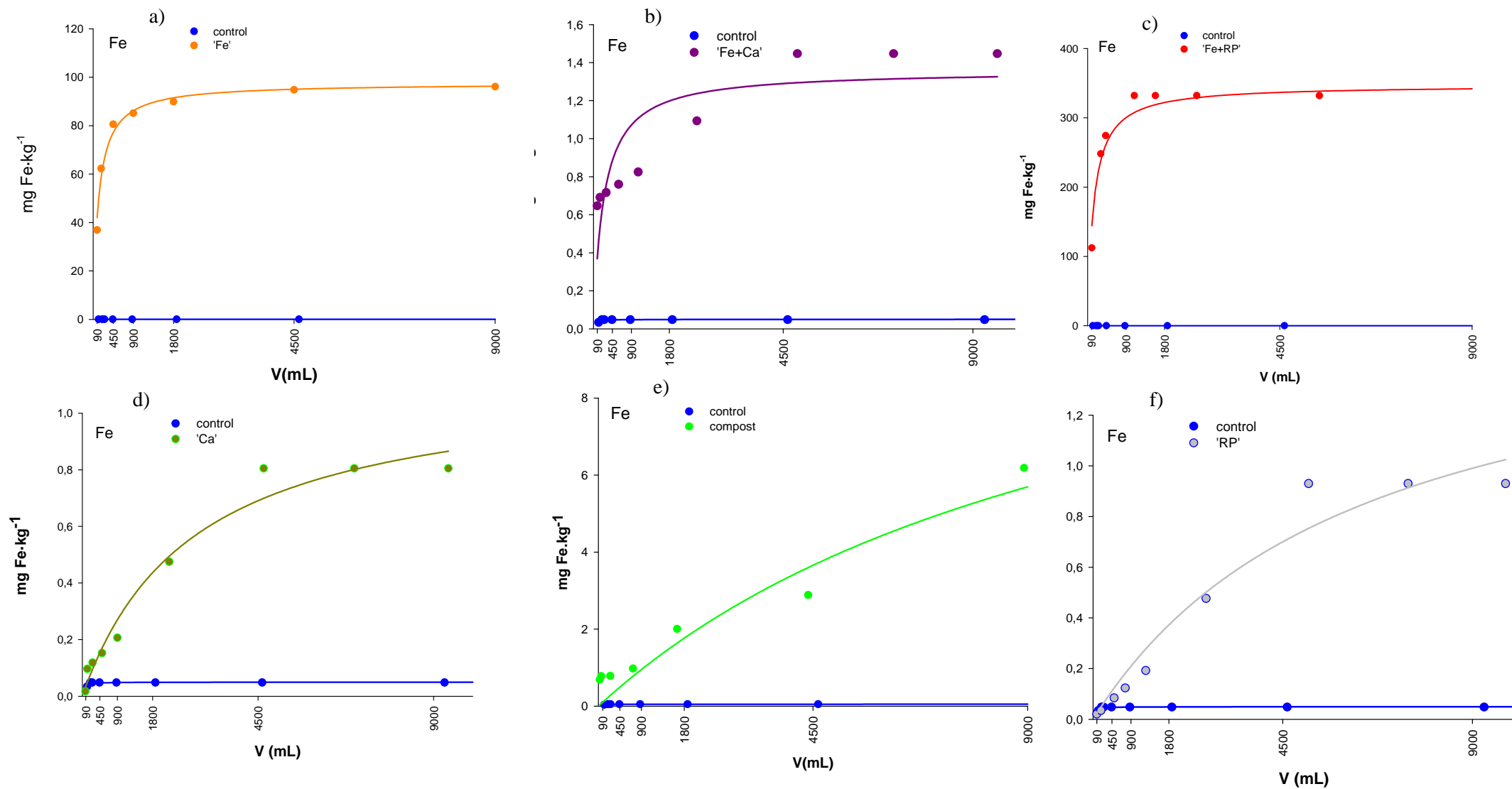


Figura 32. Concentración acumulada de Fe ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en los lixiviados de todos los tratamientos junto con el control: a) 'Fe'; b) 'Fe+Ca'; c) 'Fe+RP'; d) 'Ca'; e) 'GWC'; f) 'RP'

3.5 Ecuaciones de las curvas de lixiviación

Para determinar qué tratamientos conllevan un mayor riesgo para el medio por la movilización de los elementos traza tras el aporte de enmiendas, se ha planteado el ajuste matemático de la lixiviación acumulada a diversas funciones, teniendo en cuenta la significación de los parámetros de las funciones resultantes y la significación global del modelo. Los puntos se han representado en gráficos donde el volumen real acumulado aparece en abscisas y la concentración acumulada de elementos traza en ordenadas. El ajuste se ha hecho mediante el programa estadístico SigmaPlot 11.0, obteniendo dos tipos: ajuste a funciones hiperbólicas tipo Michaelis-Menten [1] y exponenciales [2]:

$$[1] \quad [ET] = [ET]_{\max} \cdot X / (V_m + X)$$

$$[2] \quad [ET] = a \cdot b^x$$

donde $[ET]_{\max}$ es la concentración máxima de elemento traza lixiviada; V_m es el volumen de agua necesario para que la concentración de elemento lixiviado sea la mitad del total en [1]; y en [2] 'a' es una constante que multiplica la base 'b' a la que está elevado el volumen acumulado. Estas ecuaciones nos permiten comparar la velocidad de lixiviación entre tratamientos mediante el análisis de diferencia de medias de los parámetros que las conforman.

El objetivo primordial es determinar el comportamiento general de los elementos contaminantes y establecer si es en los momentos iniciales de la lixiviación cuando el riesgo de movilización de elementos traza es mayor o por el contrario la movilización no se produce a corto plazo y la retención de contaminantes es de cierta durabilidad. Estos hechos conducirán al establecimiento de ciertas recomendaciones, como la de aportes adicionales de enmiendas, la exclusión de ciertas enmiendas del programa de remediación o la reconsideración de dosis diferentes de enmiendas desde el inicio. Los resultados obtenidos en este ensayo deben ser evaluados con prudencia, puesto que la lixiviación de elementos en condiciones reales de campo está sujeta además a otras variables que no se tienen en cuenta en este modelo, como los ciclos de secado y lavado, la previsión de precipitaciones, temperatura y humedad del suelo, el papel de las plantas y la interacción raíz-microorganismos, etc.

Análisis estadístico de las diferencias entre parámetros de las funciones de ajuste

En el apartado 3.4 se han discutido los mecanismos que podrían participar en la retención o liberación de los elementos traza estudiados. En este apartado se confirma mediante un ajuste matemático la contribución de las enmiendas a la retención o movilización de elementos contaminantes en el suelo y las diferencias existentes entre tratamientos.

Se han llevado a cabo análisis de diferencias de medias entre los valores de ET_{max} y V_m entre tratamientos por elemento traza. De esta manera se determina si la concentración máxima lixiviable y/o el volumen requerido para que se lixivie la mitad del total acumulado son estadísticamente diferentes entre tratamientos. Además, teniendo en cuenta ambos parámetros, se puede estimar si el riesgo de lixiviación se producirá a corto plazo, o si no es tan inminente tras la puesta en marcha de la circulación de agua. En el caso de las funciones exponenciales, se ha realizado un análisis similar con los parámetros integrantes de la ecuación para ilustrar las posibles diferencias entre las tasas de lixiviación entre tratamientos, teniendo en cuenta que todas las funciones son crecientes. A excepción del Mn, la concentración acumulada de los demás elementos en todos los tratamientos se ha podido ajustar al mismo tipo de función, lo que facilita la comparación estadística entre ellos.

En la Tabla 40 se muestran las ecuaciones hiperbólicas de Cu, Mn, Zn y Fe para los tratamientos en los que la significación del modelo de ajuste a funciones hiperbólicas fue robusta.

Todas las enmiendas a excepción de 'GWC' redujeron la concentración máxima final de Cu con respecto al control, en el siguiente orden:

$$Fe+RP < Ca \approx Fe+Ca \approx RP < Fe < no\ enmendado < GWC$$

En los tratamientos en los que la ET_{max} fue significativamente similar ('Ca', 'Fe+Ca' y 'RP') se observaron diferencias en la velocidad con la que el Cu fue lixiviado. La liberación de Cu fue más rápida en 'Ca' (seguido de 'RP' y de 'Fe+Ca'), donde fue necesario menos volumen de agua para que se lixiviera la mitad del total acumulado. Por consiguiente, en función de V_m , el menor riesgo de lixiviación se consiguió con 'Fe+Ca'. En el tratamiento 'Fe+RP' se registró el menor valor de V_m , por lo que podría existir cierto riesgo de lixiviación de Cu a corto plazo en comparación con el control. La concentración máxima de Cu en el tratamiento 'Fe' fue baja según los valores la Comunidad de Madrid (orden 2770/2006) y de los criterios de calidad de aguas superficiales (Real Decreto 60/2011), por lo que aunque a corto plazo la lixiviación fuera superior a la producida en el control (V_m inferior) no existiría riesgo. El aporte de compost ('GWC') hizo que la concentración de Cu inicial no se diferenciara de la del control, sin embargo a partir un volumen de agua de 4500 mL, se observa un incremento de la lixiviación, indicando

que el aporte de compost no implica ningún riesgo inicial, pero si a más largo plazo, aunque sin superar los valores máximos permitidos por la legislación en agua para el consumo humano (Real Decreto 140/2003, $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

La concentración máxima acumulada de Zn se redujo con todas las enmiendas en comparación con el control, excepto con 'Fe'. Entre los tratamientos que alcanzaron valores estadísticamente similares de ET_{\max} , 'Fe+RP' fue el tratamiento que supondría un mayor riesgo, dado que el valor de V_m es más bajo que en 'Fe+Ca', 'RP' y 'Ca'. Como se observa en las gráficas del Zn a corto plazo, añadir 'Fe+RP' supuso que la lixiviación de Zn fuera superior al control, a pesar de que el valor de ET_{\max} fue inferior, dado que el valor de V_m fue un orden de magnitud superior en el control. Se estima que las concentraciones máximas lixiviadas de Zn en el control y en 'GWC' son estadísticamente similares, pero sin embargo, el tratamiento con compost implicaría menor riesgo puesto que se requiere una mayor cantidad de agua para lixiviar la mitad del total acumulado. A largo plazo, por tanto, el tratamiento 'GWC' es uno de los más efectivos en la retención de Zn. Esto pone de manifiesto que no solo es importante tener en cuenta la máxima lixiviación en el tiempo, dado que a tiempos cortos el efecto de la enmienda no es el mismo que a largo plazo, así como la fuerte influencia que el régimen de agua tiene sobre la lixiviación de los elementos traza.

La concentración de Fe se diferenció claramente entre los tratamientos en los que se añadió sulfato ferroso ('Fe' y 'Fe+RP') con la excepción de 'Fe+Ca', donde el pH básico condiciona la liberación de Fe, reflejado en el bajo valor de $[ET]_{\max}$.

En cuanto al Mn, el ajuste de la lixiviación acumulada a funciones exponenciales en los tratamientos 'Ca', 'RP' y 'GWC' (ajustes exponenciales Tabla 41) apunta a que la disponibilidad de Mn a largo plazo será superior que con el aporte de otras enmiendas, dado el carácter creciente de las funciones de ajuste. En los tratamientos con ajustes hiperbólicos, teniendo en cuenta la ET_{\max} , 'Fe+Ca' redujo la concentración máxima lixiviada de Mn en comparación con el control, aunque los valores no fueron estadísticamente inferiores. En comparación con 'Fe+Ca', existieron diferencias en el ritmo de lixiviación en los tratamientos 'Fe' y 'Fe+RP', de manera que este último tratamiento se puede considerar el más apropiado a largo. Para poder dilucidar si en los tratamientos 'Ca', 'RP' y 'GWC' la lixiviación de Mn puede suponer un riesgo para el medio, y ante el diferente ajuste llevado a cabo en comparación con el control, se ha estimado la concentración de Mn liberada cuando pasó el volumen correspondiente a V_m del control ($6828 \pm 1567 \text{ mL}$), representada por $ET_{1/2}$ y el volumen necesario para alcanzar el mismo valor de la concentración máxima del control ($ET_{\max} = 8,2 \pm 0,8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) representada por V_{\max} (Tabla 42). La estimación de la concentración $ET_{1/2}$ fue inferior a la mitad de la concentración máxima del

tratamiento control ($4,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), y el volumen lixiviado para alcanzar $8,19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Mn es un volumen elevado tanto en 'Ca' como en 'GWC'. La curva creciente del tratamiento 'RP' se acerca más a la del control, de manera que se puede estimar el punto del eje X en el que ambas funciones se cortarían. Ese punto coincide con una estimación de volumen de alrededor de 16000 mL. Por consiguiente, entre los tres tratamientos con tendencia exponencial son más recomendables 'Ca' y 'GWC' que 'RP'.

IV.2 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en mesocosmos

Tabla 40. Ajustes matemáticos de la concentración acumulada de elementos traza a funciones hiperbólicas ($f=a*x/(b+x)$). [ET] se muestra en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y el V_m en mL. Se muestra el valor de R^2 y la significación del modelo de ajuste (Sig.). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,05$). Las funciones de ajuste de la concentración acumulada de Mn en los tratamientos 'Ca', 'RP' y 'GWC' se indican en la Tabla 11. No enmendado: 'NE'; FeSO_4 : 'Fe'; CaCO_3 : 'Ca'; $\text{FeSO}_4+\text{CaCO}_3$: 'Fe+Ca'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelera: 'Fe+RP'; compost: 'GWC'.

Elemento	Tratamiento	Ajuste	[ET] _{max}	V_m	R^2	Sig.
Cu	'NE'	Hiperbólico	0,50±0,14 b	7629,1±3909,4 a	0,9630	<0,0001
	'Fe'	Hiperbólico	0,31±0,01 c	586,4±77,4 c	0,9859	<0,0001
	'Ca'	Hiperbólico	0,12±0,007	528,7±119,3 c	0,9449	<0,0001
	'Fe+Ca'	Hiperbólico	0,13±0,011	1758,2±450,8 b	0,9630	<0,0001
	'RP'	Hiperbólico	0,13±0,008	1158,8±230,6 b	0,9643	<0,0001
	'Fe+RP'	Hiperbólico	0,02±2·10 ⁻⁵	2,67±0,37 d	0,8733	<0,0001
	'GWC'	Hiperbólico	2,94±1,68 a	46005,5±32297,6	0,9886	<0,0001
Mn	'NE'	Hiperbólico	8,19±0,76 b	6827,7±1567,4 a	0,9822	<0,0001
	'Fe'	Hiperbólico	12,25±0,52	597,0 ±92,9 b	0,9802	<0,0001
	'Ca'	Exponencial				
	'Fe+Ca'	Hiperbólico	6,97±0,12 b	478,2±34,9 b	0,9942	<0,0001
	'RP'	Exponencial				
	'Fe+RP'	Hiperbólico	11,5±0,3 a	590,8±75,3 b	0,9772	<0,0001
	'GWC'	Exponencial				
Zn	'NE'	Hiperbólico	2,15±0,067	1063,9±132,0 bc	0,9845	<0,0001
	'Fe'	Hiperbólico	3,93±0,15 a	410,9±63,9 c	0,9773	<0,0001
	'Ca'	Hiperbólico	1,03±0,12	5736,1±1398,9 ab	0,9876	<0,0001
	'Fe+Ca'	Hiperbólico	0,83±0,10	6369,1±1502,5 a	0,9883	<0,0001
	'RP'	Hiperbólico	0,89±0,14	6491,2±1998,4 a	0,9787	<0,0001
	'Fe+RP'	Hiperbólico	1,05±0,019	123,5±16,2 c	0,9578	<0,0001
	'GWC'	Hiperbólico	2,06±0,66	29389,8±13595,8	0,9843	<0,0001
Fe	'NE'	Hiperbólico	0,05±0,001	28,1±11,01 c	0,5358	0,0161
	'Fe'	Hiperbólico	97,5±1,9 b	119,2±13,2 c	0,9802	<0,0001
	'Ca'	Hiperbólico	1,13±0,11 b	2860,3±746,1 ab	0,9752	<0,0001
	'Fe+Ca'	Hiperbólico	1,35±0,12 b	241,2±101,2 bc	0,6955	0,00502
	'RP'	Hiperbólico	1,69±0,36 b	6372,1,2±2704,6	0,9603	<0,0001
	'Fe+RP'	Hiperbólico	347,1±7,89	140,8±22,17 c	0,9453	0,0001
	'GWC'	Hiperbólico	12,84±2,63	11219,6±4641,8 a	0,9661	0,0001

Tabla 41. Ajustes matemáticos de la concentración acumulada de Mn a funciones exponenciales ($f=a*b^x$). Se muestra el valor de R^2 y la significación del modelo de ajuste (Sig.). CaCO_3 : 'Ca'; residuo de papelería: 'RP'; compost: 'GWC'.

Elemento	Tratamiento	Ajuste	a	B	R^2	Sig
Mn	'Ca'	Exponencial	$0,15 \pm 0,02$	$1,0001 \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$	0,9027	<0,0001
	'RP'	Exponencial	$0,29 \pm 0,07$	$1,0002 \pm 2,9 \cdot 10^{-5}$	0,9480	<0,0001
	'GWC'	Exponencial	$0,17 \pm 0,04$	$1,0001 \pm 1,6 \cdot 10^{-5}$	0,9489	<0,0001

Tabla 42. Estimación de concentración media de Mn ($ET_{1/2}$) cuando pasó el volumen correspondiente a V_m del control; y el volumen necesario para alcanzar la concentración máxima de Mn alcanzada en el tratamiento control. CaCO_3 : 'Ca'; residuo de papelería: 'RP'; compost: 'GWC'.

Elemento	Tratamiento	$ET_{1/2} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	$V_{\max} (\text{mL})$
Mn	'Ca'	0,29	40000
	'RP'	1,14	16700
	'GWC'	0,34	38750

En el ajuste exponencial de la acumulación de As se han utilizado los parámetros 'a' y 'b' para evaluar el crecimiento de la función exponencial (Tabla 43). Un mayor valor de 'a' y 'b' indica una mayor lixiviación del contaminante para un mismo volumen de agua que circule por la columna. Tanto a corto como a largo plazo, se observó que el menor riesgo de lixiviación de As se consiguió con el aporte de sulfato ferroso, y el mayor en los tratamientos 'Ca', 'RP' y 'GWC'. 'Fe+Ca' y 'Fe+RP' implicaron riesgo a largo plazo, como se ha mencionada previamente, pero a corto plazo fueron efectivos. No hubo diferencias entre los parámetros 'a' y 'b' en los tratamientos con materiales encalantes, 'Ca' y 'RP', lo que indica que el ritmo de movilización de As fue estadísticamente similar. En los tratamientos 'Fe+Ca' y 'Fe+RP' la estimación de la lixiviación de As se ha realizado mediante dos ajustes exponenciales (Tabla 44 y 45), dado que el ajuste único con todos los puntos no reflejaba las observaciones realizadas durante los primeros muestreos y las ecuaciones de lixiviación estimaban concentraciones de As a corto plazo muy superiores a las registradas. El primer ajuste se realizó hasta la fracción de volumen acumulado donde se observa que la lixiviación de As es significativamente inferior a la del control. Para comparar, se realizó el mismo tratamiento a los datos del control. Hay que destacar dos aspectos: (i) con el ajuste para las primeras fracciones se observa que la estimación de la

concentración de As es significativamente inferior a la del control, mientras que en las últimas fracciones el comportamiento es el opuesto; y (ii) para una misma cantidad de volumen de agua se lixivia más As en 'Fe+Ca' que en 'Fe+RP', por lo que en este último tratamiento el efecto de la retención de As es más duradero.

El patrón de liberación de As del suelo difiere del de los metales, puesto que la tendencia de la función exponencial sugiere que la lixiviación de As continúa aumentando, mientras que la de los metales se estabiliza, lo que se refleja en la disminución de la pendiente de las funciones en las últimas fracciones, al haberse desorbido las fracciones más fácilmente intercambiables.

Tabla 43. Ajustes matemáticos de la concentración acumulada de As (realizada en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a funciones exponenciales crecientes ($f=a*b^x$). Se muestra el valor de la base (b) y de la constante que la multiplica (a) así como el valor de R^2 y la significación del modelo de ajuste (Sig.). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P<0,05$). NE: no enmendado; FeSO_4 : 'Fe'; CaCO_3 : 'Ca'; residuo de papelera: 'RP'; compost: 'GWC'.

Elemento	Tratamiento	Ajuste	a	b	R^2	Sig.
As	'NE'	Exponencial	$65,8 \pm 17,3$ c	$1,0003 \pm 3 \cdot 10^{-5}$	0,9533	<0,0001
	'Fe'	Exponencial	$8,3 \pm 2,9$ cd	$1,0001 \pm 5,3 \cdot 10^{-5}$	0,4733	<0,1
	'Ca'	Exponencial	$960,5 \pm 270,9$ a	$1,0003 \pm 3,2 \cdot 10^{-5}$	0,9646	<0,0001
	'RP'	Exponencial	$873,0 \pm 227,1$ a	$1,0003 \pm 2,8 \cdot 10^{-5}$	0,9702	<0,0001
	'GWC'	Exponencial	$364,7 \pm 61,0$ b	$1,0004 \pm 2,0 \cdot 10^{-5}$	0,9983	<0,0001

Tabla 44. Ajustes matemáticos de la concentración acumulada de As (realizada en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a funciones exponenciales crecientes ($f=a*b^x$). Fe+Ca-1 se corresponde con las curvas ajustadas hasta un volumen de 600 mL aproximadamente. Fe+Ca-2 se corresponde con las curvas ajustadas desde ese volumen en adelante. Se muestra el valor de la base (b) y de la constante que la multiplica (a) así como el valor de R^2 y la significación del modelo de ajuste (Sig.). $\text{FeSO}_4+\text{CaCO}_3$: 'Fe+Ca'. La representación gráfica se corresponde con las Figuras 28f.

Tratamiento	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2	Sig
Fe+Ca-1	4,3±0,03	1,0024±1,5·10 ⁻⁵	0,9999	<0,0001
Fe+Ca-2	1003,4±392,7	1,0003±4,4·10 ⁻⁵	0,9424	0,0013
Control-1	8,1±1,3	1,0040±0,0004	0,9803	<0,01
Control-2	88,8±19,3	1,0002±2,3·10 ⁻⁵	0,9772	0,0015

Tabla 45. Ajustes matemáticos de la concentración acumulada de As (realizada en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a funciones exponenciales crecientes ($f=a*b^x$). Fe+RP-1 se corresponde con las curvas ajustadas hasta un volumen de 2500 mL aproximadamente. Fe+RP-2 se corresponde con las curvas ajustadas desde ese volumen en adelante. Se muestra el valor de la base (b) y de la constante que la multiplica (a) así como el valor de R^2 y la significación del modelo de ajuste (Sig.). FeSO_4 +residuo de papelería: 'Fe+RP'. La representación gráfica se corresponde con las Figuras 28e.

Tratamiento	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2	Sig
Fe+RP-1	0,34±0,13	1,0017±0,0001	0,9927	<0,0001
Fe+RP-2	546,8±209,4	1,0002±3·10 ⁻⁵	0,9820	<0,05
Control-1	25,5±7,3	1,0009±0,002	0,8937	<0,05
Control-2	113,5±20,4	1,0002±210 ⁻⁵	0,9707	<0,05

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El tratamiento 'Fe' fue el más eficiente en la retención de As en el suelo. El tratamiento 'Fe+RP' seguido de 'Fe+Ca' fueron efectivos a corto plazo pero a largo plazo la concentración acumulada de As registrada superó a la del control. La tendencia de la lixiviación de As se diferenció de la de los metales: éstos experimentaron una fuerte desorción inicial para estabilizarse después, mientras que la tendencia exponencial del As implica que ésta continuará en el tiempo sin poder realizarse una estimación de la concentración máxima liberada
- Existieron diferencias en cuanto al efecto de un mismo tratamiento, sobre todo la lixiviación de elementos traza a corto y largo plazo, especialmente de la de As. Esto pone de manifiesto que en condiciones de campo es necesario intervenir tras un tiempo determinado, añadiendo nuevos aportes de enmiendas. La monitorización es necesaria para determinar el momento en el que se producen cambios en el comportamiento de los elementos
- Los elementos traza respondieron de manera diferente ante un mismo tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento 'Fe+Ca' fue en el que se observó un ritmo de lixiviación más lento para el Cu y Zn, pero no para el Mn. La reducción de la lixiviación de Mn fue efectiva con la adición de carbonato cálcico y con el compost en comparación con el control, pero no la de As, la cual aumento significativamente, junto con los otros tratamientos encalantes. El carácter multicontaminado del suelo dificulta la selección de una enmienda para estabilizar todos los elementos analizados

Considerando estos resultados, las recomendaciones en cuanto a la adición de enmiendas para la remediación de suelos contaminados de la mina de arsenopirita de Bustarviejo son:

- Es imprescindible la incorporación de una enmienda que suministre hierro para la formación de nuevas fases minerales de Fe. En este caso se ha usado sulfato ferroso, que ha permitido que el efecto de retención del As en el suelo fuera de larga duración cuando se añade solo. Se requieren ensayos adicionales con el aporte de otros materiales que suministren Fe en concentraciones suficientes para asegurar la retención del As en el suelo, priorizando el uso de materiales de reciclaje y subproductos de determinadas actividades industriales (hierro laminado, escorias de hierro, hierro laminado, etc)

- La fuente de hierro deberá ir acompañada de otro material que garantice un valor de pH del suelo óptimo para la supervivencia vegetal, dentro del rango en el que la solubilidad del arsénico sea mínima. Los tratamientos en los que se añadió CaCO_3 o residuo de papelería al FeSO_4 , 'Fe+Ca' y 'Fe+RP', se proponen como los apropiados para añadir a los suelos de la mina, puesto que a corto plazo redujeron la concentración de As y tuvieron un efecto beneficioso para la mayoría de los metales. En ambos tratamientos, valores de pH de los lixiviados superiores a 8 y 7,2 respectivamente se tradujeron en las subidas más importantes de As. Por tanto, sería recomendable que para la aplicación en campo de cualquiera de las enmiendas propuestas se establezca un límite de pH. En el tratamiento 'Fe+RP' el muestreo inmediatamente anterior al que registró la subida de As en los lixiviados fue de 6,9, por lo que un pH inferior a ese valor puede asegurar la estabilidad en la retención del As
- A largo plazo se requiere el aporte adicional de materiales que suministren Fe y la monitorización del pH. Las ecuaciones de lixiviación no sirven para precisar exactamente el momento de los cambios de la movilización de elementos traza (en las ecuaciones equivalente a 2500 mL y 600 mL de agua en 'Fe+RP' y 'Fe+Ca' respectivamente), pero ayudan a estimar si el riesgo es a corto o a más largo plazo
- Para futuros ensayos en columnas de lixiviación, proporcionaría una gran aportación al programa de remediación el estudio de materiales que aportaran Fe junto con composts. El gran aumento de la movilización de As dificulta la puesta en marcha de un programa de remediación solo con compost sin la combinación con otro material para paliar el incremento de As en los lixiviados

En el capítulo siguiente se evaluarán las mismas enmiendas en mesocosmos incorporando el factor planta. Las enmiendas deben favorecer la implantación de una cubierta vegetal, siendo la supervivencia de las plantas un objetivo fundamental en la remediación de estos emplazamientos.

4. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

- Incorporation of ferrous sulphate was the most efficient treatment in reducing water soluble As. 'Fe+RP' followed by 'Fe+Ca' were effective in the short term, but in the long term As leaching increased significantly over the control. Arsenic and metal leaching patterns were different and were fitted to exponential growth and hyperbolic functions respectively. Metal concentration reached a maximum concentration, suggesting that the strong initial de-sorption from the soil decreased, leading to depletion of the soluble metal fractions. Due to the exponential growth of As, it was not possible to estimate its maximum concentration (V_{\max})
- There were differences between the effects amendments triggered on element mobilisation in the short and long term, especially arsenic, showing that additional amendment incorporations are beneficial in field application. Monitoring of changes in metal(loid)s mobility is required
- Trace element response to amendment incorporation was not homogeneous. 'Fe+Ca' reduced the rate of leaching of Cu and Zn, but not Mn. In the long term, soluble Mn concentration was efficiently reduced in 'Ca' and 'GWC', but both treatments increased soluble As concentrations dramatically. These results suggest that the multi-contaminant characteristics of these soils hamper the selection of a proper amendment for this site's recovery

The following recommendations are proposed to promote site recovery of the Mónica mine in Bustarviejo:

- Iron-bearing additives are essential to retain As in soils by means of newly formed iron mineral phases. Ferrous sulphate has contributed to long term As retention. Other materials with sufficient iron should be tested, such as materials obtained from recycling processes and industrial by-products (iron grit, iron powder)
- It is recommended that the iron source is combined with other additives which contribute to pH stabilisation within a range optimal for the development of vegetation cover and for minimal As solubilisation. 'Fe+Ca' and 'Fe+RP' are the treatments proposed as the best

options for As in the short term and metal stabilisation. In these treatments, pH values above 8 and 7.2 respectively led to remarkable increments of As solubility compared to the previous fraction. Consequently, the establishment of a pH limit must be considered when applying these amendments in field conditions. For the 'Fe+RP' treatment, pH values below 6.9 help retain arsenic

- In the long term and in field conditions, additional incorporations of iron based amendments are required and continuous pH monitoring is essential. Leaching functions do not provide information about the precise moment when the occurrence of severe changes in trace element mobility take place (2500 and 6000 mL of water in Fe+RP' and 'Fe+Ca' respectively) but help to evaluate the risk in the short or long term
- Future experiments with leaching columns should incorporate an iron-bearing source together with composts, as the large As concentration leached from 'GWC' prevents its application alone in arsenic contaminated soils

In the next chapter, these amendments will be tested in experiments with plants. Amendments should promote establishment of plant cover, a priority in the remediation of mine sites.

CAPÍTULO IV.2

APLICACIÓN DE ENMIENDAS A SUELOS CONTAMINADOS EN ENSAYOS EN MESOCOSMOS. EFECTOS SOBRE LA MOVILIDAD DE ELEMENTOS TRAZA

El uso de enmiendas permite la retención o movilización de elementos traza en el suelo dependiendo del objetivo a conseguir. Es una de las herramientas que forma parte de la estrategia de fitoestabilización asistida, cuya implantación está cada vez más aceptada en la recuperación de suelos mineros.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La incorporación de enmiendas al suelo es una práctica habitual para modificar la movilización de elementos traza y reducir los riesgos por lixiviación en el suelo y/o traslado de elementos contaminantes a la cadena trófica y a otros compartimentos ambientales.

Tras haber estudiado la movilidad de elementos traza en las columnas de lixiviación, se ha considerado necesario el ensayo de las enmiendas en mesocosmos con plantas en condiciones controladas.

El objetivo de este trabajo es determinar los materiales más efectivos para la reducción de la movilización de arsénico y metales pesados. El reto se centra en la disminución o la estabilización de arsénico y metales pesados simultáneamente en un mismo suelo. Así mismo, la creación de condiciones favorables para la implantación de una cubierta vegetal que impida la movilización de metales y la erosión del suelo es otro de los propósitos a conseguir.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Preparación de suelo y planta

El suelo fue recogido en las inmediaciones de la mina Mónica en Bustarviejo (Madrid). El material contaminado se obtuvo de la zona de las escombreras y el suelo no contaminado en un área próxima a la mina. Ambos materiales se secaron al aire durante una semana en el invernadero de la Universidad Autónoma de Madrid y se tamizaron a 4 mm. Tras ello se procedió a mezclar el suelo no contaminado y el escombro en una proporción 60:40 (p/p) para obtener un sustrato homogéneo en el que las plantas pudieran crecer. El contenido de cada tiesto se homogeneizó a mano junto con la correspondiente enmienda. Se utilizaron tiestos de 2 L de capacidad. Se depositó una capa de grava (hasta 1 cm de diámetro) de 2 cm de altura en el fondo del tiesto y todos los materiales mezclados se introdujeron en los tiestos. Las enmiendas, y por tanto los tratamientos, fueron los siguientes (entre paréntesis se muestra la nomenclatura de cada uno de ellos):

No enmendado, control ('NE')

FeSO₄ 1% p/p ('Fe')

CaCO₃ 1% p/p ('Ca')

FeSO₄ 1% p/p + CaCO₃ 1% p/p ('Fe+Ca')

Residuo de papelería 1% p/p ('RP')

FeSO₄ 1% p/p + residuo de papelería 1% p/p ('Fe+RP')

FeSO₄ y CaCO₃ fueron suministrados por Sigma Aldrich y el residuo de papelería por la empresa Holmen Paper (Madrid).

Los tiestos se dejaron equilibrar durante un mes al 70% de su capacidad de campo, previamente determinada. Transcurrido este periodo de tiempo se procedió a la siembra de 100 semillas de *Arrhenatherum elatius* subsp. *Bulbosum* y 100 semillas de *Festuca curvifolia* (recogidas en la mina Mónica) en cada una de las dos mitades del tiesto. Se insertaron horizontalmente sondas de succión, para la extracción de agua de la solución del suelo (sondas Rhizon, Eijkelkamp, 10 cm longitud, 2,5 mm diámetro) en cada uno de los tiestos. La primera extracción de la solución del suelo se recogió en el momento de la siembra y a partir de ese momento se realizó semanalmente durante cinco semanas. El experimento tuvo lugar en el invernadero de la Universidad Autónoma de Madrid bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Se utilizaron cuatro replicados por tratamiento.

2.2 Seguimiento y muestreo del ensayo

Durante las cinco semanas de ensayo, los tiestos se regaron periódicamente para mantener el 70% de la capacidad de campo y evitar que se secaran. Se recogía semanalmente agua procedente de la disolución del suelo a través de las sondas de extracción insertando tubos de vacío en el conector exterior de la sonda. En total, se recogieron cinco fracciones de la disolución del suelo y se almacenaron a 4 °C para su conservación hasta su posterior análisis.

Al finalizar el ensayo, se procedió a la recogida del suelo y de las plantas. Se cortó la parte aérea de las especies sembradas, se determinó el peso fresco y se secaron en estufa durante cinco días a 60 °C. Las raíces de las plantas no fueron muestreadas. Se recogieron muestras de suelo para la determinación del elemento total y disponible. Esto se realizó mediante la homogeneización a mano del suelo del tiesto, del cual se tomó una fracción para su secado y posterior tamizado a 2 mm para la determinación de As y metales. Una fracción del suelo se almacenó a 4 °C para el posterior análisis enzimático y la realización de bioensayos (Capítulo V).



Figura 33. Imágenes de los tiestos y de las sondas de extracción de la solución del suelo insertadas en los tiestos.

2.3 Determinaciones analíticas

Se determinó el elemento total y extraíble con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M del suelo no contaminado+escombro y el total del residuo de papelera (As y metales). La determinación de As y metales en la disolución del suelo fue realizada en la extracción obtenida con las sondas previo filtrado. El material vegetal fue sometido a una mineralización ácida en autoclave. El elemento soluble en los materiales residuo de papelera y compost se realizó mediante una

agitación con agua miliQ en proporciones 1:10 (p/v). Las muestras se agitaron por volteo durante 24 horas. El extracto se filtró (Whatman nº40) y se acidificaron hasta su análisis.

La concentración de arsénico y de metales total y disponible en suelo fue analizada por espectroscopía de fluorescencia atómica (Millenium Excalibur, PS Analytical) para el As y por espectroscopía de absorción atómica para los metales (AA800, Perkin Elmer). En la disolución del suelo y en planta todos los elementos fueron analizados mediante ICP-MS (Sciex Elan 6000, Perkin Elmer).

La medida de pH en suelo se realizó tras la interacción de suelo y agua destilada en las proporciones 1:2,5 (p/v) respectivamente. Se utilizó un electrodo Mettler Toledo InlabScience. Los valores de pH de la solución de suelo fueron analizados directamente sin necesidad de una preparación previa de las muestras. El análisis de pH del residuo de papelera se realizó en una extracción 1:10 (p/v) con agua destilada. La conductividad eléctrica de todos los materiales sólidos (suelo no contaminado, escombros, mezcla de ambos y residuo de papelera) fue determinada tras su interacción con agua destilada en una proporción 1:10 (p/v) durante 1 hora con agitación. Se usó un electrodo Crison 5070.

La materia orgánica fue determinada mediante pérdida por ignición durante 5 horas a 550 °C en horno mufla.

El tratamiento estadístico se realizó según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos.

3. RESULTADOS

3.1 Parámetros iniciales del suelo

La Tabla 46 muestra los parámetros iniciales de todos los materiales usados en este ensayo (suelo no contaminado, escombros, mezcla de suelo no contaminado+escombros y residuo de papelería).

El pH inicial del suelo no contaminado, alrededor de 6, fue mayor que el del escombros, (alrededor de 4). Cuando ambos materiales se mezclaron, el pH de la mezcla alcanzó valores no superiores a 5. Un mes después del equilibrado de los tiestos, en el momento de la siembra, el pH del suelo fue analizado (Tabla 47). Comparado con el pH inicial de la mezcla (Tabla 46), hubo un aumento significativo del mismo como resultado de la incorporación de ciertas enmiendas, sobre todo 'Ca', 'Fe+Ca', 'RP' y 'Fe+RP' ($P < 0,05$). La adición de FeSO_4 (tratamiento 'Fe') causó un descenso del pH inicial de los tiestos en una unidad y media, a valores por debajo de 4.

La concentración total de As y metales en el escombros fue elevada, hasta $4.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de As total, lo que contribuyó a que el sustrato resultante de la mezcla del suelo no contaminado con el escombros contuviera también una alta concentración de elementos traza. El residuo de papelería fue el único material enmendante que suministró cierta cantidad de Mn, Cu y Zn, pero en menores cantidades que las que contiene la mezcla suelo no contaminado+escombros (Tabla 46).

IV.2 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en mesocosmos

Tabla 46. Caracterización del suelo no contaminado (NC), escombros, suelo no contaminado + escombros (NC+E, proporción 60:40 p/p) y residuo de papelera (RP), media±ET; n=3. n.d: por debajo del límite de detección. El elemento extraído de NC, Escombros y NC+E se refiere al extraíble con sulfato amónico 0,1M, y el extraído del residuo de papelera se corresponde al soluble.

	NC	Escombros	NC+E 60:40	RP
pH	6,0±0,01	4,1±0,01	4,9±0,03	7,7 ± 0,01
Materia orgánica (%)	3,9±0,1	0,6±0,01	3,3±0,04	29,3 ± 0,4
Conductividad eléctrica (μS·cm⁻¹)	14,2±1,2	46,3±6,2	37,0±0,1	253,0±9,6
Elemento total (mg·kg⁻¹)				
As	17,3±4,8	4265,8±506,1	1595,9±33,9	0,3±0,07
Cu	27,9±1,9	758,1±178,1	327,1±35,3	151,8±6,3
Mn	267,1±62,8	219,9±19,6	207,5±19,9	85,4±18,0
Zn	42,5±8,3	2455,1±430,2	910,9±133,6	41,1±5,9
Cd	n.d	40,3 ± 3,7	19,3 ± 0,3	8,7 ± 0,6
Elemento extraíble (mg·kg⁻¹) o soluble				
As	n.d	7,4±0,3	2,1±0,04	n.d
Cu	n.d	10,0±0,1	1,9±0,05	35,6±17,4
Mn	2,7±0,1	4,5±0,5	3,9±0,1	0,2±0,04
Zn	0,7±0,1	21,1±0,3	8,7±0,05	n.d
Cd	n.d	1,3 ± 0,5	0,1 ± 0,01	n.d

Tabla 47. Valores de pH obtenidos en suelo no contaminado+escombros un mes después del equilibrado de los tiestos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. No enmendado (NE); FeSO₄ ('Fe'); CaCO₃ ('Ca'); FeSO₄+CaCO₃ ('Fe+Ca'); residuo de papelera ('RP'); y FeSO₄+residuo de papelera ('Fe+RP'). (P< 0,05).

Tratamiento	pH
'NE'	5,0±0,03 c
'Fe'	3,3±0,02 d
'Ca'	8,2±0,07 a
'Fe+Ca'	7,4±0,04 ab
'RP'	7,5±0,08 ab
'Fe+RP'	6,6±0,10 b

3.2 Análisis de la disolución del suelo

Se muestran los valores de pH de todos los muestreos en la Figura 34. En el tratamiento 'RP' se produjo un incremento progresivo y significativo a lo largo del ensayo, aunque no fue así para el resto de tratamientos (ANOVA de dos factores, Tabla 48). Los valores de pH más bajos correspondieron a los del tratamiento 'Fe', mientras que los tratamientos 'Ca', Fe+Ca' y 'RP' contribuyeron a los mayores aumentos de pH de la disolución del suelo con respecto al tratamiento sin enmienda. La disolución del suelo extraída en el tratamiento 'Fe+RP' presentó valores de pH similares a los obtenidos en el tratamiento sin enmienda ($P < 0,05$).

Para la representación de la concentración de As y metales en la disolución del suelo solo se muestran el primer y el último muestreo, puesto que las concentraciones de elementos por tratamiento no fueron significativamente diferentes en el tiempo (ANOVA de dos factores, variable Muestreo, Tabla 49, Figura 35). La adición del residuo de papelera ('RP') y la de CaCO_3 ('Ca') produjo un aumento significativo de la concentración de As en la disolución del suelo en comparación con los suelos sin enmienda (290 y 400 % de media aumento respectivamente), mientras que los tratamientos 'Fe+RP' y 'Fe+Ca' lo disminuyeron significativamente (88 y 70% de media de reducción respectivamente). Estos dos últimos tratamientos fueron los más efectivos en la reducción de la concentración de As soluble en todos los muestreos de la disolución del suelo. No se encontraron diferencias significativas de la concentración de As en el tratamiento 'Fe' en comparación con los suelos no enmendados ($P < 0,05$).

Se observó un aumento muy significativo de la concentración de metales en la disolución del suelo en los tratamientos 'Fe' y 'Fe+RP' (Figura 34). La concentración de metales fue muy elevada en comparación con 'NE' (de media: en 'Fe' 360 veces mayor el Mn, 5000 el Cu y 450 el Cd; en 'Fe+RP' 135 veces mayor el Mn, 380 el Cu y 145 el Cd). Los tratamientos 'Ca' y 'RP' redujeron eficientemente el Mn y Zn soluble en la disolución del suelo comparado con 'NE'. Sin embargo, ninguna de las enmiendas tuvo efecto alguno en la disminución del Cu soluble ($P < 0,05$). A continuación se muestra una clasificación de la efectividad de las enmiendas en la reducción de la fracción soluble de los metales y arsénico, de mayor a menor en orden de efectividad. El tratamiento sin enmienda queda incluido en la lista ($P < 0,05$):

As: Fe+Ca, Fe+RP > NE, Fe > RP > Ca

Cu: NA > Fe+Ca > Ca ~ RP > Fe+RP > Fe

Mn: Ca ~ RP > NA ~ Fe+Ca > Fe+RP ~ Fe

Zn: Ca ~ Fe+Ca ~ RP > NA > Fe+RP ~ Fe

Cd: Ca ~ Fe+Ca ~ RP > NA > Fe ~ Fe+RP

Las correlaciones bivariadas entre los elementos traza y los valores de pH en la disolución del suelo mostraron una relación lineal significativa entre ambas variables en todos los muestreos (Tabla 49), siendo positiva para el As ($P < 0,05$) y negativa para Cu, Mn, Zn, Cd y Fe ($P < 0,01$). Los coeficientes de Pearson explicaron entre un 40 y un 70% la varianza de la variable dependiente (concentración de elemento).

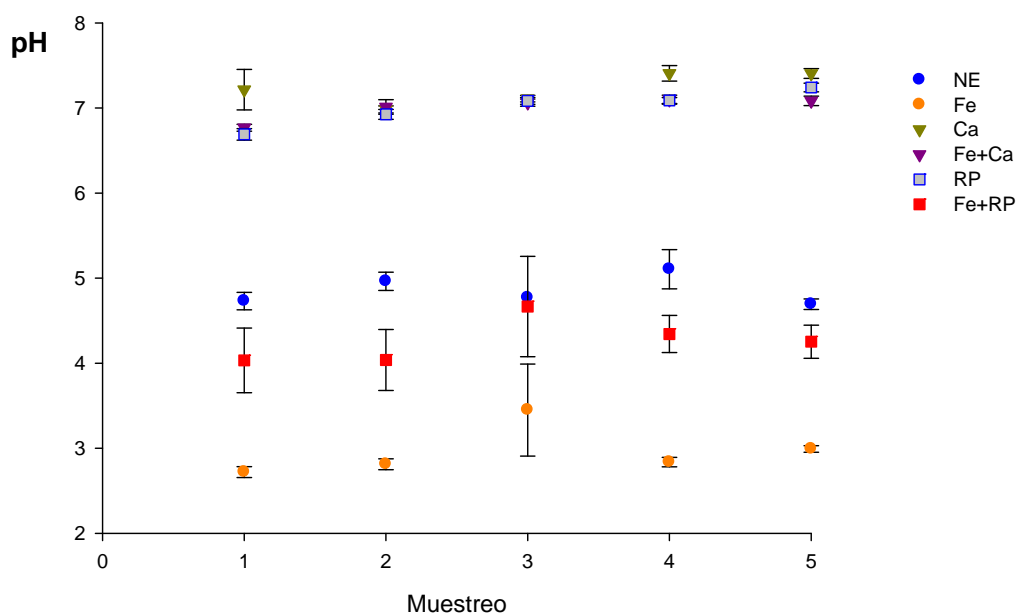
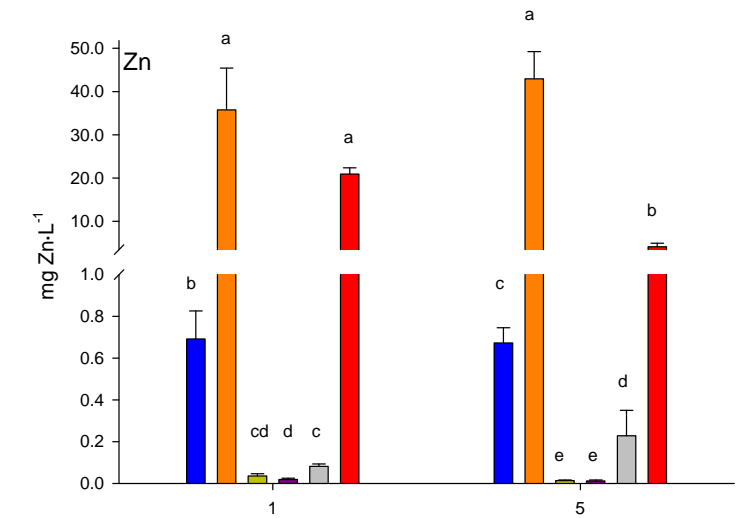
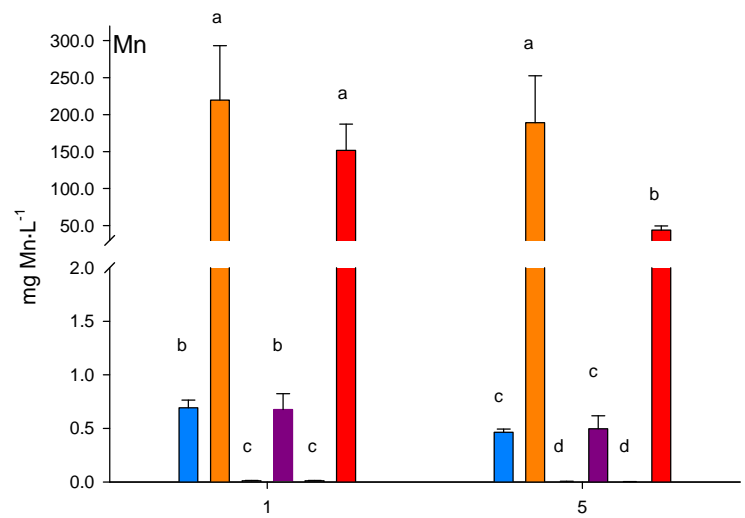
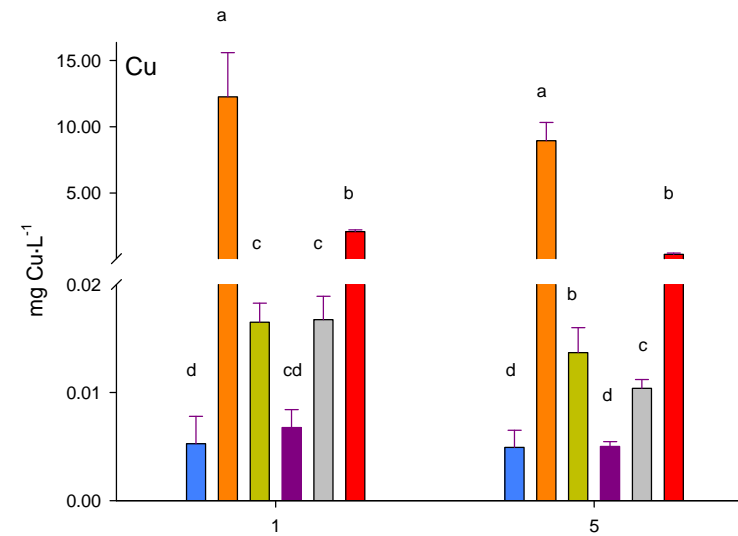
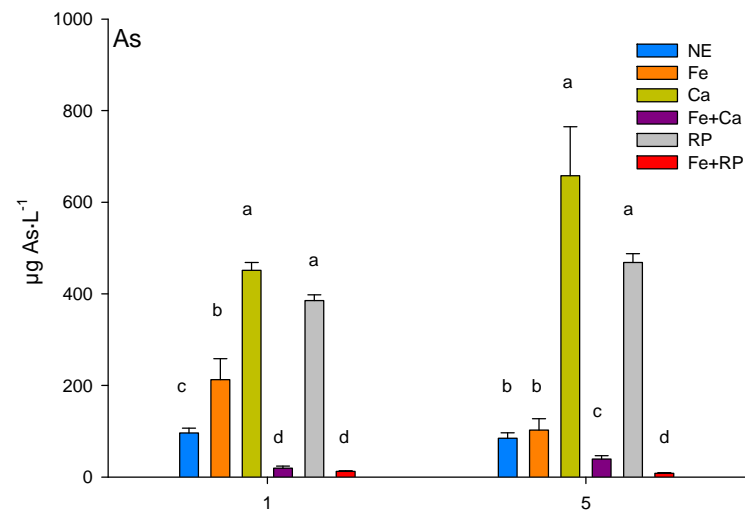


Figura 34. Valores de pH de la disolución del suelo en los cinco muestreos (media \pm ET, n=4). Tratamientos: no enmendado (NE); FeSO_4 ('Fe'); CaCO_3 ('Ca'); $\text{FeSO}_4 + \text{CaCO}_3$ ('Fe+Ca'); residuo de papelera ('RP'); y FeSO_4 +residuo de papelera ('Fe+RP'). Las diferencias estadísticas entre tratamientos son idénticas en cada uno de los muestreos: 'Ca', 'Fe+Ca', 'RP' > 'NE' > 'Fe+RP' > 'Fe' ($P < 0,05$).



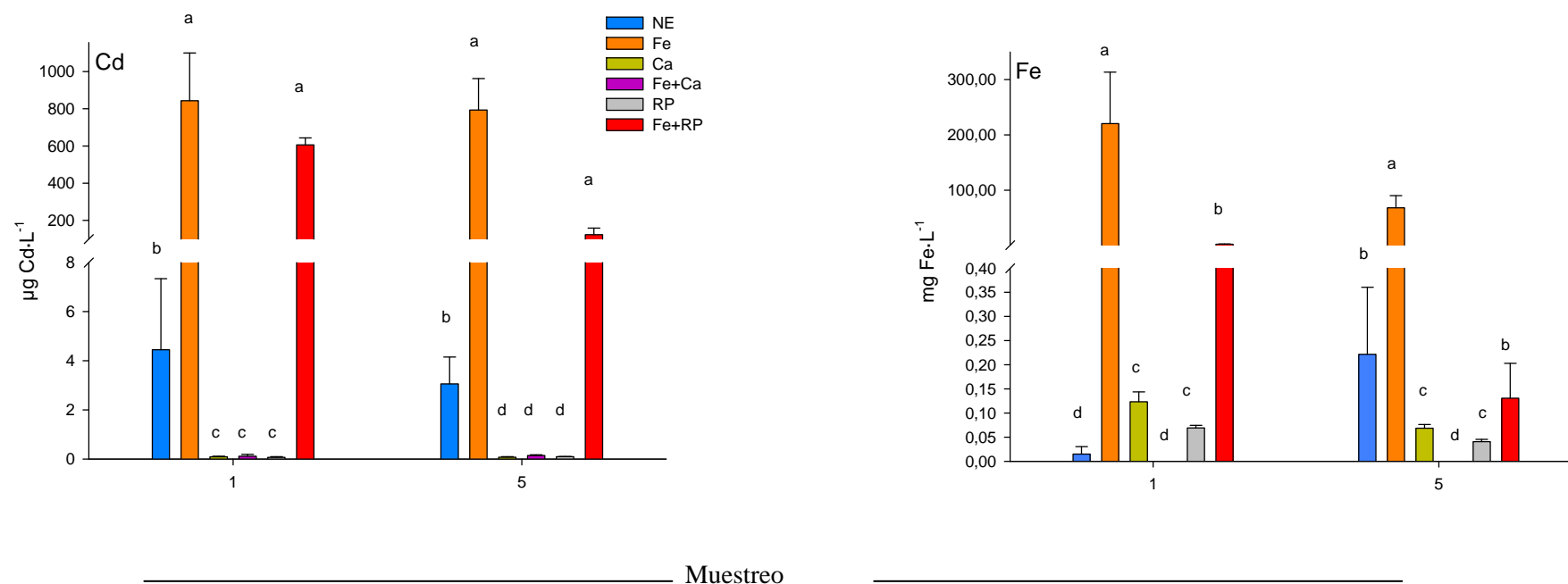


Figura 35. Concentración de As, Cu, Mn, Zn, Cd y Fe en la disolución del suelo en los muestreos 1 y 5 (media±ET, n=4). Solo se muestran estas dos fracciones porque no se observaron cambios significativos en el tiempo. Las barras verticales representan los tratamientos aplicados en cada muestreo: no enmendado (NE), FeSO₄ ('Fe'); CaCO₃ ('Ca'); FeSO₄+CaCO₃ ('Fe+Ca'); residuo de papelera ('RP'); y FeSO₄+residuo de papelera ('Fe+RP'). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada muestreo (P<0,05).

IV.2 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en mesocosmos

Tabla 48. Análisis de la varianza de dos factores. Factor Muestreo: fracciones 1-5; factor Tratamiento: no enmendado (NE), FeSO_4 ('Fe'), CaCO_3 ('Ca'), $\text{FeSO}_4+\text{CaCO}_3$ ('Fe+Ca'), residuo de papelería ('RP'), y FeSO_4 +residuo de papelería ('Fe+RP'); para la concentración de As, Cu, Mn, Zn y Cd y pH de la disolución del suelo. n.s: no significativo.

ANOVA	As	Cu	Mn	Zn	Cd	pH
Tratamiento	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Muestreo	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	0,020
Tratamiento*Muestreo	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

Tabla 49. Coeficientes de Pearson en las correlaciones bivariadas entre concentración de elementos traza en la disolución del suelo y pH en cada muestreo (n=4); *, ** las correlaciones son estadísticamente significativas a $P<0,05$ y $P<0,01$ respectivamente.

Muestreo	As	Cu	Mn	Zn	Cd	Fe
1	0,426*	-0,690**	-0,757**	-0,779**	-0,763**	-0,565**
2	0,325	-0,711**	-0,737**	-0,781**	-0,777**	-0,605**
3	0,428*	-0,629**	-0,613**	-0,659**	-0,655**	-0,633**
4	0,506*	-0,726**	-0,697**	-0,749**	-0,778**	-0,685**
5	0,618*	-0,670**	-0,650**	-0,703**	-0,696**	-0,588**

3.3 Biomasa y concentración de metal(oide)s en planta

Las semillas germinaron adecuadamente y la mayoría de las plántulas crecieron satisfactoriamente, excepto en el tratamiento 'Fe', donde el porcentaje de germinación fue muy bajo y las semillas que consiguieron germinar murieron días después de la emergencia.

El peso fresco medio de *A. elatius* fue mayor que el de *F. curvifolia* al final del ensayo (Tabla 50). Las dos especies presentaron diferentes ritmos de crecimiento. *Arrhenaterum elatius* creció más rápidamente y se extendió más en la superficie del tiesto que *F. curvifolia*.

El menor desarrollo de la biomasa de ambas especies fue en el tratamiento sin enmienda, mientras que el mayor desarrollo de la parte aérea se encontró en los tratamientos Ca', 'Fe+Ca' y 'RP'. Ninguna de las plantas presentó clorosis o puntas necróticas en la parte aérea, excepto en el tratamiento sin enmienda, donde además presentaron una menor altura que en el resto de tratamientos.

Tabla 50. Peso fresco de las plantas ($\text{g} \cdot \text{tiesto}^{-1}$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos por cada especie vegetal ($\text{media} \pm \text{ET}$, $n=4$, $P < 0.05$). No enmendado (NE), FeSO_4 ('Fe'); CaCO_3 ('Ca'); $\text{FeSO}_4 + \text{CaCO}_3$ ('Fe+Ca'); residuo de papelera ('RP'); $\gamma\text{FeSO}_4 + \text{residuo de papelera}$ ('Fe+RP'). No se muestran resultados en el tratamiento 'Fe' puesto que las plantas no crecieron.

Tratamiento	<i>A. elatius</i>	<i>F. curvifolia</i>
'NE'	1,45 \pm 0,12 b	0,41 \pm 0,05 c
'Fe'	-	-
'Ca'	2,46 \pm 0,04 a	0,82 \pm 0,05 a
'Fe+Ca'	2,32 \pm 0,06 a	0,78 \pm 0,07 a
'RP'	2,38 \pm 0,09 a	0,85 \pm 0,05 a
'Fe+RP'	1,47 \pm 0,07 b	0,61 \pm 0,05 b

El aporte de enmiendas fue efectivo en la reducción de la concentración de As en la parte aérea de ambas especies vegetales en comparación con 'NE', excepto en el tratamiento 'Ca', en el que no se observaron diferencias significativas en comparación con el tratamiento sin enmienda (Tabla 51). Además, la concentración de Zn en el tejido vegetal disminuyó, excepto en *F. curvifolia* en el tratamiento 'Fe+Ca'. Los tratamientos 'Ca' y 'RP' redujeron la concentración de Mn en el tejido vegetal, pero aumentaron en 'Fe+RP' seguido de 'Fe+Ca' en *F. curvifolia*. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de Cu entre tratamientos en *A. elatius*, pero no en *F. curvifolia*. La concentración de Cd en ambas especies fue muy baja, incluso por debajo del límite de detección en la mayoría de los tratamientos a los que se sometió *A. elatius*.

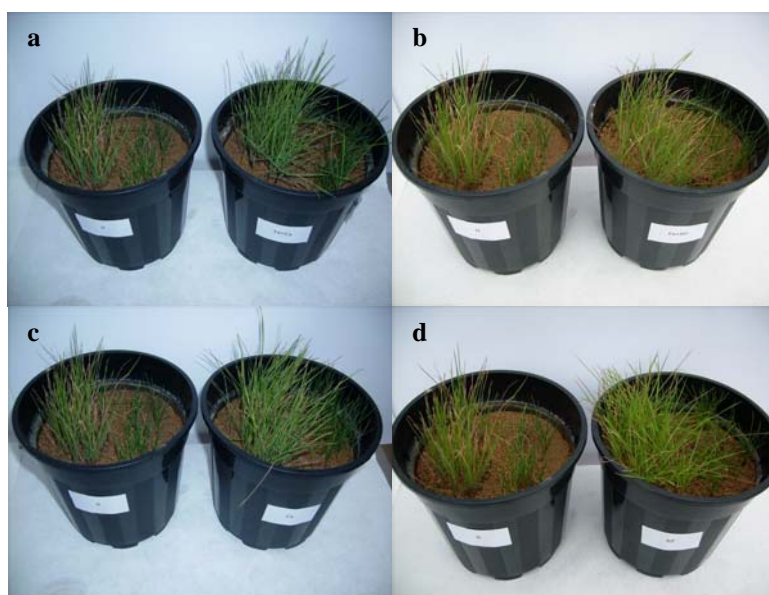


Figura 36. Aspecto de los tiestos al final del ensayo. Comparación dos a dos con el control. En cada foto el control sin enmienda se encuentra a la izquierda. a) con 'Fe+Ca'; b) con 'Fe+RP'; c) con 'Ca'; d) con 'RP'.

Tabla 51. Concentración de elementos traza en la parte aérea de *A. elatius* y *F. curvifolia* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos por especie vegetal y por elemento, media \pm ET, n=4, P< 0,05. n.d: por debajo del límite de detección.

	'NE'	'Ca'	'RP'	'Fe+Ca'	'Fe+RP'
As					
<i>A. elatius</i>	17,4 \pm 1,8 a	15,5 \pm 1,9 a	11,6 \pm 0,8 b	9,5 \pm 0,7 b	9,9 \pm 0,6 b
<i>F. curvifolia</i>	18,7 \pm 4,9 a	14,9 \pm 2,5 a	13,6 \pm 1,1 b	12,9 \pm 0,7 b	14,0 \pm 2,5 b
Cu					
<i>A. elatius</i>	7,1 \pm 1,1 b	13,5 \pm 0,7 a	17,5 \pm 9,3 a	10,5 \pm 1,5 b	9,1 \pm 1,6 b
<i>F. curvifolia</i>	23,9 \pm 5,9 a	31,9 \pm 11,7 a	14,4 \pm 2,9 a	23,6 \pm 3,8 a	19,3 \pm 2,1 a
Mn					
<i>A. elatius</i>	410,9 \pm 22,5 b	146,4 \pm 7,7 c	210,8 \pm 4,5 c	439,1 \pm 13,9 b	630,4 \pm 58,9 a
<i>F. curvifolia</i>	71,2 \pm 8,1 c	80,2 \pm 6,3 bc	128,9 \pm 6,9 c	369,4 \pm 11,9 a	282,3 \pm 32,6 b
Zn					
<i>A. elatius</i>	101,6 \pm 20,8 a	31,5 \pm 2,5 b	34,7 \pm 4,2 b	41,7 \pm 1,8 b	43,2 \pm 5,1 b
<i>F. curvifolia</i>	88,7 \pm 8,9 a	56,4 \pm 2,4 b	55,2 \pm 2,8 b	86,6 \pm 7,1 a	63,8 \pm 5,5 b
Cd					
<i>A. elatius</i>	0,4 \pm 0,2	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>F. curvifolia</i>	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,6 \pm 0,05	0,8 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1

4. DISCUSIÓN

En los emplazamientos en los que existe un evento de multicontaminación, tal como al que se hace frente en esta Tesis, se requiere tratar simultáneamente con elementos que poseen un comportamiento químico diferente, tales como arsénico y metales. Para recomendar una enmienda adecuada que reduzca y/o estabilice la movilización de metales y arsénico, no se deben considerar únicamente los efectos producidos sobre cada elemento de forma individual, sino evaluar la mejor y más favorable opción para el conjunto de ellos.

La legislación en materia de suelos contaminados en la Comunidad de Madrid ha establecido unos niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza para la protección de la salud humana, y las medidas necesarias que se deben adoptar en caso de contaminación (ORDEN 2770/2006). Aunque la mayoría de las legislaciones sobre máximos valores permitidos en suelo están basados en la concentración total de elemento, la disolución del suelo proporciona una información más realista sobre el riesgo que pueden provocar los elementos contaminantes y es más útil para la evaluación del impacto en el medio que el valor de elemento total en suelo (Temminghoff et al., 1998; Allen, 2001). Este hecho subraya la necesidad de incluir otros valores en las legislaciones para determinar riesgos potenciales de los elementos traza sobre a salud humana y del medio ambiente. En la legislación española todavía no hay valores de referencia basados en la concentración soluble de metaloides aunque sí se describen los criterios para el cálculo de los niveles genéricos de referencia para la protección de los ecosistemas basados en la determinación de los umbrales ecotoxicológicos, lo cual es un avance. Sigue siendo necesario optimizar estos criterios con toda la información disponible y todos los avances conseguidos hasta la fecha para la correcta evaluación del potencial riesgo de la matriz tóxica e incluirlos en la redacción de futuras legislaciones.

4.1 Suelo

El arsénico presenta una gran afinidad por las superficies de los óxidos de Fe, Mn y Al, formando complejos de esfera interna con el hierro (De Brouwere et al., 2004; Fitz y Wenzel, 2002). Estudios previos muestran que las enmiendas en cuya composición está presente el hierro, como la goetita o hierro laminado, reducen la lixiviación de As y Cd (Hartley et al., 2004). Sin embargo, la incorporación de FeSO_4 en este trabajo no disminuyó la concentración soluble de arsénico en comparación con los suelos sin enmienda (Figura 34). Además, contribuyó a un gran aumento de Cu, Mn, Zn y Cd soluble. En general, la adición de FeSO_4 produce óxidos férricos y

conduce a la formación de formas muy insolubles de arseniato junto con una bajada del pH (Artiola et al., 1990). Para ello, previamente, ocurre la oxidación de los iones ferroso a férrico de manera espontánea en presencia de oxígeno. La actividad de Fe^{3+} mantenida por los óxidos de Fe(III) y las formas amorfas de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ en el suelo es mayor a medida que el pH baja. Por lo tanto, la probabilidad de que ocurra la formación de oxihidróxidos de Fe a un pH de 2,5 es menor que a valores más altos de pH. También, cuando el pH baja de 2,5, el arsénico puede ser encontrado sin carga (Zhang y Selim, 2008). Teniendo en cuenta estos datos y que la cantidad añadida de sulfato ferroso causó una gran disminución del pH, el arsénico probablemente no pudo ser retenido en las partículas del suelo.

‘RP’ y ‘Ca’ fueron los tratamientos en los que el arsénico aumentó en mayor medida en la solución del suelo, además contribuyendo a la mayor reducción de Zn, Mn y Cd, conforme a un aumento del pH de la solución del suelo. Fitz y Wenzel (2002) observaron que la solubilidad de As aumentaba en los suelos en un intervalo de pH de 3-8. De acuerdo con este dato, en el tratamiento ‘RP’, el pH aumentó significativamente a lo largo de todo el ensayo, como lo hizo la concentración de As en la solución del suelo.

Muchos trabajos subrayan que el encalado de los suelos conlleva una subida de pH y por consiguiente una inmovilización de metales puesto que son menos solubles en condiciones alcalinas (Adriano, 2001). Es una práctica común en aquellos suelos con alto contenido de metales (Madejon et al., 2011). En la bibliografía se encuentran numerosos ejemplos de la utilización de enmiendas para incrementar el pH, como el aporte de óxidos de calcio o los lodos de remolacha azucarera, que pueden reducir la extractabilidad de Cu, Pb y Zn (Alvarenga et al., 2008b); la incorporación de materia orgánica junto con el encalado puede ayudar a aumentar el pH del suelo logrando la inmovilización de metales como Cu, Zn, Mn y Cd (Clemente et al., 2008). La adición conjunta de FeSO_4 con el residuo de papelería y de FeSO_4 con carbonato de calcio en el presente trabajo (‘Fe+RP’, ‘Fe+Ca’), produjo la disminución de la concentración de As soluble, probablemente debido a la formación de oxihidróxidos de Fe a valores de pH más altos que los obtenidos con la adición única de FeSO_4 . Efectos similares fueron observados por Hartley et al. (2004). Según Alloway (1995), el valor de pH correspondiente al punto cero de carga (pH_{pzc}) de los óxidos de hierro se encuentra en el rango 7-11, con lo que valores de pH inferiores al pH_{pzc} contribuyen a que las superficies de los óxidos se encuentren cargadas positivamente. Por tanto, la retención de arsénico estaría favorecida en estos tratamientos combinados, siempre que el pH se mantenga en torno a esos valores y no descienda alrededor de los encontrados en el tratamiento ‘Fe’. Pero con respecto a la inmovilización de metales, el tratamiento ‘Fe+RP’ no fue tan eficaz como ‘Fe+Ca’, puesto que los valores de pH de la solución del suelo con ‘Fe+RP’

estuvieron próximos a 4,3, lo que provocó que la movilización de los metales fuera del mismo orden que en el tratamiento 'Fe'. A pesar de ello, ante los buenos resultados obtenidos para el As, se debe experimentar con dosis más elevadas de residuo de papelera junto con sulfato de hierro para obtener mezclas de pH más elevado aunque por debajo del punto cero de carga de las superficies de los oxihidróxidos.

Por tanto, el pH es un parámetro que tuvo efectos muy significativos sobre la in/movilización de arsénico. Como muestran las correlaciones bivariadas (Tabla 50), el pH explicó hasta el 70% de la varianza de la variable dependiente (concentración de As en la solución del suelo).

4.2 Planta

Ninguna de las plántulas que emergieron en el tratamiento 'Fe' logró sobrevivir. Se sabe que la solubilidad del aluminio es mayor a bajo pH, siendo un factor limitante de la producción vegetal en suelos ácidos (Delhaize y Ryan, 1995). La concentración de Al en la disolución del suelo en el tratamiento 'Fe' fue lo suficientemente alta como para causar toxicidad ($140\text{-}1200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en 'Fe'; $0,012\text{-}0,80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en 'NE'). El crecimiento vegetal también estuvo limitado en el intervalo de pH 4-5, pero en menor medida, como se observó en el tratamiento 'Fe+RP'. Este último no mejoró la producción de biomasa como hizo el residuo de papelera por sí solo; probablemente porque el residuo de papelera aportado junto con el sulfato de hierro no fue capaz de aumentar el pH hasta valores superiores a 5. Algunos autores han descrito el escaso efecto de la adición de un material encalante, solo o combinado con sulfato ferroso, sobre la producción vegetal (Hartley y Lepp, 2008). Sin embargo, la combinación de CaCO_3 con FeSO_4 ('Fe+Ca') aumentó el pH de la disolución del suelo, lo que fue determinante para permitir un mayor crecimiento vegetal. El incremento de la biomasa fue del 65 y 92% de media para *A. elatius* y *F. curvifolia* respectivamente en comparación con el control sin enmienda. El resto de enmiendas, como 'Ca' y 'RP', también consiguieron aumentar la producción de biomasa, mostrando que el encalado de suelo es una práctica beneficiosa. Las técnicas de fitoestabilización pueden crear una cubierta vegetal de larga duración capaz de mantenerse por sí misma y dificultar la dispersión de la contaminación (Robinson et al., 2006). La incorporación del residuo de papelera, con un cierto contenido de materia orgánica (25% de materia orgánica) puede contribuir a la creación de un medio propicio para el crecimiento de *A. elatius* y *F. curvifolia*.

La elevada concentración de As soluble registrada en los tratamientos 'Ca' y 'RP' no se reflejó en la absorción de As por la planta, o al menos en la translocación a la parte aérea. La

misma tendencia se observó para el Zn y el Cu, también a pesar del aumento de la solubilidad de estos elementos en 'Fe+RP', aunque el Mn en *A. elatius* sí se correlacionó positivamente con la concentración de Mn soluble. Adriano et al. (2004) observaron que el aporte de enmiendas al suelo favoreció la reducción de la fracción soluble de metales, pero no modificó la absorción por la planta. La rápida movilización de los elementos traza en el suelo puede limitar la absorción de los mismos por las raíces de las plantas (Beesley y Dickinson, 2009). Además, tanto *A. elatius* como *F. curvifolia* se encontraban en los primeros estadios de su crecimiento, con raíces jóvenes de poca longitud y desarrollo. Estos dos últimos aspectos pudieron haber afectado a la falta de homogeneidad de la respuesta de las plantas ante los cambios introducidos por las enmiendas en el suelo.

Arrhenaterum elatius y *F. curvifolia* son especies autóctonas de la mina Mónica en Bustarviejo. Poseen un carácter cespitoso, con raíces fasciculadas que se extienden en la superficie y contribuyen fácilmente a fijar el suelo. La supervivencia de las plantas es crucial, puesto que funcionan como una barrera para los contaminantes dificultando su dispersión por distintas vías hacia otros compartimentos, tales como la atmósfera o la hidrosfera.

Teniendo en cuenta que no se pudo deducir un efecto claro de las enmiendas sobre la concentración de elementos en planta, el objetivo prioritario con las plantas se debe centrar en la creación de condiciones favorables para la supervivencia y la producción de biomasa como base para que la posterior atenuación natural ocurra espontáneamente y sea exitosa. Algunas de las enmiendas utilizadas contribuyeron a la reducción de As y metales en la disolución del suelo mejorando la situación en la que no se realiza ningún aporte de materiales enmendantes, y permitiendo un buen desarrollo vegetal. Por tanto, como Clemente et al. (2006) describieron, la incorporación de enmiendas es una herramienta válida como paso previo a los procesos de atenuación natural. El proceso de atenuación natural debe ser monitorizado en el tiempo, para asegurar el éxito de las prácticas llevadas a cabo durante la fase de aplicación de enmiendas

5. CONCLUSIONES

- Las sondas de extracción han permitido hacer un seguimiento de los cambios producidos en la solubilidad de arsénico y metales pesados causados por la aplicación de enmiendas
- Debido al carácter aniónico del arsénico los resultados obtenidos muestran efectos contrarios en la movilización de arsénico y de metales pesados en un mismo tratamiento. Los cambios han sido dependientes principalmente de la variación del pH y de la adición de Fe
- Las enmiendas que han contribuido al aumento del pH del suelo y de la disolución del suelo (alrededor de 6-7) han mejorado el crecimiento vegetal. Sin embargo la concentración de elementos traza en el tejido vegetal no fue significativamente afectada por el aporte de enmiendas, aunque no es descartable que la absorción pueda ser modificada en momentos más avanzados del estadio de crecimiento de las plantas o en condiciones de campo
- La enmienda 'Fe+Ca' fue el material más apropiado para reducir la movilización de arsénico y para estabilizar la de las concentraciones solubles de metales (Cu, Mn, Zn, Cd) en comparación con los suelos sin enmienda. Además favoreció el crecimiento de las plantas, permitiendo el establecimiento de una cubierta vegetal

5. CONCLUSIONS

- Rhizon samplers enabled monitoring of the changes in trace element mobility caused by the incorporation of amendments to the soils. The effects on metal(loid) lability by amendment incorporation have been appropriately reflected in the soil solution extracts measured over the course of the experiment
- The addition of amendments had opposite effects on arsenic and metal mobilisation. As and metal solubility have been mainly dependent on pH changes and Fe addition
- Plant growth was improved by the amendments capable of increasing soil and pore water pH to values around 6-7. Plant uptake did not reflect trace element concentration in pore water, although some differences were found in plant absorption among treatments. Changes in the absorption pattern cannot be ruled out in longer term experiments and/or field studies
- The 'Fe+Ca' treatment would be the most suitable amendment, as it reduced arsenic mobility and did not increase soluble metal concentrations compared to the unamended soil. It also promoted plant growth, favouring the establishment of vegetation

CAPÍTULO IV.3

APLICACIÓN DE ENMIENDAS A SUELOS CONTAMINADOS EN ENSAYOS EN MACROCOSMOS

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se han utilizado las mismas plantas herbáceas que en el Capítulo IV.2 (*Arrhenatherum elatius* subsp. *Bulbosum* y *Festuca curvifolia*), pero se plantaron en contenedores de volumen superior al de los tiestos. De igual manera que en los ensayos de mesocosmos, se procedió a realizar una incorporación de enmiendas.

El objetivo de este capítulo es determinar el efecto de las enmiendas sobre:

- La movilidad de elementos traza en suelos contaminados por residuos piríticos, analizando la fracción soluble de elemento extraída con sondas de succión y con sulfato amónico 0,1M
- El crecimiento de especies herbáceas junto con su potencial capacidad de absorción de elementos traza

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo se ha realizado en contenedores de grandes dimensiones (140x60x40 cm). Los contenedores fueron rellenados con material contaminado procedente de las escombreras de la mina de arsenopirita de Bustarviejo (20% en peso) y con suelo no contaminado procedente de los alrededores de la Universidad Autónoma de Madrid (80% en peso) hasta llegar a un total de 200 litros. La razón de esta mezcla viene determinada por el pH del material no contaminado. Al poseer un pH menos ácido que el suelo no contaminado recogido de la mina en anteriores ocasiones, se requería una menor proporción de escombro para llegar a niveles de As extraíbles similares a los de anteriores ensayos. Sin embargo la concentración de As total se redujo como consecuencia de la menor proporción del escombro en la mezcla.

El suelo no contaminado y el escombros fueron mezclados en una hormigonera en las proporciones mencionadas y añadidos a los contenedores, en los cuales previamente se depositó una capa de grava (4 cm de diámetro) de 3 cm de espesor. Los contenedores poseían dos orificios para evitar la inundación de los mismos con el riego, uno en la cara frontal y otro en la base. Una vez añadido el material sólido mezclado, los contenedores se utilizaron previamente a la siembra de las dos herbáceas para un cultivo de *S. atrocinerea* y *C. scoparius*, de un año de duración. Tras este periodo de tiempo, las anteriores especies fueron extraídas por completo y se procedió a la incorporación de las enmiendas mediante su aporte directo a los contenedores mezclándose vigorosamente a mano con el suelo de la superficie. Se plantaron 5 plantas de *A. elatius* subsp. *Bulbosum* y *F. curvifolia* por balsa. Las plantas fueron germinadas previamente en sustrato de turba a partir de semillas recogidas en la propia mina de arsenopirita de Bustarviejo.

Las enmiendas aplicadas fueron las siguientes:

- No enmendado, control
- Compost procedente de residuos de poda 3% p/p ('Cmp')
- FeSO₄ 1% p/p+ compost 3% p/p ('Fe+Cmp')
- Residuo de papelera 1% p/p ('RP')
- FeSO₄ 1% p/p + residuo de papelera 1% p/p 'Fe+RP'

El compost usado en este ensayo fue diferente al del ensayo con las columnas de lixiviación. La razón de este cambio está motivada por la gran concentración de As lixiviada de las columnas (Capítulo IV.1), lo que suponía un marcado riesgo de toxicidad. Sin embargo, las ventajas de incorporar materia orgánica para favorecer el establecimiento de la cubierta vegetal nos llevaron a ensayar con otro compost, también procedente de residuos de poda pero de un pH inferior (Tabla 52).

Cuatro meses después de la siembra, se colocaron placas de plástico de dimensiones 26x62x2 cm en la parte frontal de cada uno de los contenedores según se muestra en la Figura 37. En las placas se realizaron seis perforaciones a dos profundidades, tres a 4 cm de la superficie (A) y las otras tres a 10 cm de la primera (B). En ellas se insertaron horizontalmente sondas de succión *Rhizon* (Eijkelkamp, 10 cm de longitud, 2,5 mm de diámetro) para realizar extracciones de la disolución del suelo. Las plantas de *A. elatius* y *F. curvifolia* crecieron durante cinco meses más, en total haciéndolo durante nueve meses, tras los cuales se procedió al

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

muestreo de raíz y parte aérea, en donde se analizaron arsénico y metales (Cu, Mn, Zn y Cd). En el muestreo final se recogió suelo para realizar el análisis de pH, elemento total y extraíble con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M.



Figura 37. Vista de las balsas y de las placas de plástico con las sondas *Rhizon*. Las letras A y B representan las dos profundidades a las que se insertaron las sondas de succión: “A” a 4 cm de la superficie; “B” a 10 cm de la anterior.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Suelo

En la Tabla 52 se muestra la caracterización de los materiales iniciales: el suelo no contaminado junto con el escombros en proporción 80:20 (p/p) (NC+E), el residuo de papelería usado en anteriores capítulos y el compost. Los datos referentes a la mezcla de suelo no contaminado con el escombros pertenecen a muestras recogidas de los contenedores después del equilibrado en los propios recipientes en la fase en la que se plantaron *S. atrocinerea* y *C. scoparius*.

Tabla 52. Valores de pH, CE, materia orgánica (M.O.), y concentración total y extraíble de As y metales con sulfato amónico 0,1 M en el suelo no contaminado + escombros, residuo de papelería y compost. Los resultados de concentración se muestran en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ salvo que se indique lo contrario (media \pm ET, n=6 para suelo no contaminado + escombros; media \pm ET, n=4 para el residuo de papelería y el compost).

		Suelo no contaminado + escombros (80:20)	Residuo de papelería	Compost
pH		6,3 \pm 0,1	7,71 \pm 0,01	4,79 \pm 0,015
M.O. (%)		0,5 \pm 0,05	29,30 \pm 0,40	87,4 \pm 0,5
CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)		37,0 \pm 0,1	253,0 \pm 9,6	710,7 \pm 26,8
Elemento total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	As	1580,2 \pm 123,0	0,31 \pm 0,07	0,85 \pm 0,64
	Cu	285,1 \pm 18,82	151,8 \pm 6,3	14,4 \pm 0,9
	Zn	1217,6 \pm 75,5	85,42 \pm 18,01	24,6 \pm 2,5
	Mn	198,6 \pm 8,1	41,08 \pm 5,87	121,7 \pm 6,2
	Fe (%)	4,1 \pm 0,1		
Elemento extraíble ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	As	4,84 \pm 0,5		
	Cu	0,1 \pm 0,01		
	Mn	5,8 \pm 0,65		
	Zn	0,75 \pm 0,1		
	Fe	8,1 \pm 0,8		

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

Tabla 53. Concentración total de As y metales ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) al final del ensayo. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos para cada elemento. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO_4 +compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelera: 'Fe+RP'. $P<0,05$, media \pm ET, n=6.

Tratamiento	As	Cu	Mn	Zn	Cd
Control	1370,9 \pm 108,3 a	240,0 \pm 11,7ab	163,2 \pm 2,8 a	933,1 \pm 30,8 ab	11,4 \pm 0,5 ab
'Cmp'	1322,7 \pm 142,5 a	237,2 \pm 17,2ab	185,8 \pm 4,9 a	845,7 \pm 38,1 bc	8,2 \pm 1,0 b
'Fe+Cmp'	1427,1 \pm 169,1 a	187,2 \pm 11,4b	128,3 \pm 3,7 b	770,6 \pm 35,7 c	7,23 \pm 0,6 b
'RP'	1129,4 \pm 154,5 a	176,5 \pm 8,6b	180,4 \pm 3,7 a	695,8 \pm 34,4 cd	9,7 \pm 0,6 ab
'Fe+RP'	1424,8 \pm 125,4 a	271,9 \pm 18,7 a	175,1 \pm 5,3 a	1032,4 \pm 28,7 a	10,6 \pm 0,8 ab

Al finalizar el ensayo no se encontraron diferencias significativas en la concentración total de As entre tratamientos (Tabla 53), aunque sí en los demás elementos analizados. En capítulos anteriores se determinó que las fracciones F3, F4 y F5 de la extracción secuencial de As contenían la mayor proporción de este elemento, siendo la disponibilidad de As baja. Puesto que las enmiendas afectarán principalmente a la fracción disponible y la velocidad de intercambio de As entre fracciones parece ser lenta (Cattani et al., 2009) era previsible que la concentración total de As entre tratamientos no cambiase.

Aunque existieron diferencias entre tratamientos en el caso de los metales, los valores fueron del mismo orden. Las diferencias que se encontraron en el nivel total de metales entre tratamientos no se encontraron en ensayos anteriores en tiestos, donde la introducción del suelo en el tiesto se hacía a mano de forma sencilla y la estructura del suelo puede ser más homogénea en todos los puntos. La estructura del suelo puede modificar la movilización de elementos traza en función de la organización de las diferentes partículas, de la formación y estabilidad de los agregados y/o presencia de óxidos y otras partículas con carga (Bronick y Lal, 2005), correspondiéndose más con un escenario real en campo, donde las propiedades físicas del suelo no son uniformes en todos sus puntos. El régimen hídrico también puede dar lugar a cambios en la movilidad de los elementos traza en el suelo.

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

Tabla 54. Concentración extraíble de As y metales ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1M. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos para cada elemento. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO_4 +compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelería: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelería: 'Fe+RP'. $P<0,05$, media \pm ET, n=6. n.d: por debajo del límite de detección.

Tratamiento	As	Cu	Mn	Zn	Fe
Control	4,30 \pm 0,11 c	0,04 \pm 0,003 b	3,13 \pm 0,12 b	2,71 \pm 0,08 b	1,49 \pm 0,33 b
'Cmp'	6,42 \pm 1,10 b	0,15 \pm 0,02 a	3,31 \pm 0,30 b	0,77 \pm 0,13 c	1,40 \pm 0,44 b
'Fe+Cmp'	0,32 \pm 0,03 e	0,13 \pm 0,01 a	12,79 \pm 1,59 a	5,01 \pm 1,70 a	3,37 \pm 0,43 a
'RP'	10,51 \pm 0,24 a	0,13 \pm 0,01 a	1,29 \pm 0,12 c	0,28 \pm 0,05 d	0,72 \pm 0,04 c
'Fe+RP'	2,14 \pm 0,05 d	0,11 \pm 0,01 a	0,61 \pm 0,07 d	0,31 \pm 0,07 d	0,69 \pm 0,17 c

La concentración de As extraíble más elevada se encontró en el tratamiento con el residuo de papelería ('RP'), el cual también contribuyó al aumento del pH del suelo (Tabla 54). En el tratamiento 'Fe+RP', a pesar del incremento del pH respecto al del tratamiento control, el efecto producido por los óxidos de hierro se impone sobre el del pH, dando lugar a una mayor retención de As que en el control sin enmienda. El tratamiento 'Fe+Cmp' también redujo la concentración de As por debajo del control y del tratamiento anterior, gracias al efecto de los óxidos de hierro y del pH del suelo que no fue tan elevado como en los otros tratamientos (Tabla 55).

En el tratamiento 'Cmp', también se observó una mayor movilización de As en comparación con el control. El pH es un factor que modifica la movilización de As, pero en este caso la alteración del pH del suelo con la incorporación de compost no fue significativa en comparación con el control, por lo que otros factores deben ser los responsables de la mayor extractabilidad del As. La movilización del As con el carbono orgánico disuelto es posible, junto con la reducción de arseniato a arsenito debido a la oxidación de la materia orgánica. Como se discutirá en el siguiente apartado, la especiación de As en la disolución del suelo no sufrió cambios, descartando este factor como causante del aumento de As en la disolución del suelo. Así mismo, la formación de complejos con el Fe y con la materia orgánica, como se planteó en las columnas de lixiviación, puede contribuir a esa movilización, aunque la concentración extraíble de Fe sea estadísticamente similar a la del control.

Las correlaciones bivariadas entre la concentración extraíble de elementos y el pH (Tabla 55) demuestra que ambas variables se correlacionaron, excepto en el Cu y Cd (coeficientes de Pearson, As: 0,640; Mn: -0,967 y Zn: -0,931). Como se ha comentado en capítulos anteriores, la concentración soluble o disponible en el suelo de los elementos depende también del contenido de materia orgánica y de su grado de humificación, de la formación de complejos con ella o de la

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

movilización conjunta con moléculas orgánicas de bajo peso molecular. Sin embargo las correlaciones bivariadas muestran que los tratamientos con un contenido significativamente superior en materia orgánica, propiciado por el aporte de compost, no tuvieron efecto alguno sobre la extractabilidad de Cu, Mn, Cd y Fe en comparación con el control. La concentración de Zn en el tratamiento donde se aportó únicamente compost se redujo con respecto al control, debido probablemente a su complejación con moléculas orgánicas. El tratamiento 'Fe+Cmp' aumentó la concentración de Cu, Mn, Zn y Fe con respecto al control, debido al aporte de Fe y la acidificación asociada, que no fue compensada por el compost dado su carácter ácido. Los tratamientos 'RP' y 'Fe+RP' redujeron la concentración extraíble de Mn, Zn y Fe dado su efecto encalante.

Tabla 55. Valores de pH, conductividad eléctrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) y materia orgánica (M.O. en %). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO_4 +compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelería: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelería: 'Fe+RP'. $P<0,05$, media \pm ET, n=6.

Tratamiento	pH	CE	M.O.
Control	7,06 \pm 0,04 b	44,47 \pm 5,68 c	2,99 \pm 0,04 c
'Cmp'	7,19 \pm 0,09 b	65,30 \pm 4,40 b	5,38 \pm 0,61 a
'Fe+Cmp'	5,23 \pm 0,21 c	106,97 \pm 21,61 a	5,37 \pm 0,14 a
'RP'	7,93 \pm 0,12 a	90,05 \pm 2,96 ab	3,31 \pm 0,06 c
'Fe+RP'	7,80 \pm 0,09 a	98,82 \pm 6,37 a	4,01 \pm 0,09 b

3.2 Disolución del suelo

La disolución del suelo se muestreó a dos profundidades con una separación de 10 cm: el punto A en superficie y el punto B a 10 cm de A. En los gráficos se muestran el pH y las concentraciones de As y metales en ambos puntos con tres repeticiones por punto en cuatro muestreos realizados con una semana de diferencia entre cada uno.

pH de la disolución del suelo

El análisis de la varianza muestra que existieron diferencias significativas en el pH entre tratamientos y entre muestreos, pero no en la profundidad en la que se colocó la sonda de extracción de la solución del suelo (A y B, Figura 38, Tabla 56).

El tratamiento 'Fe+Cmp' fue el que registró un pH menor, por debajo de 7 y los tratamientos 'RP' y 'Fe+RP' los que obtuvieron valores de pH más elevados.

La disolución del sulfato ferroso y el pH ácido del compost en el tratamiento 'Fe+Cmp' causaron la disminución del pH en comparación con el resto de tratamientos. En la cuarta fracción el pH aumentó, pero no se puede determinar si estuvo causado por el agotamiento del efecto del sulfato ferroso o se trata de un punto atípico, por lo que en las siguientes fracciones el pH continuaría siendo inferior a 6,5 en A. En el punto B no se observaron diferencias entre los cuatro muestreos. Cabe pensar que la enmienda deja de ser efectiva en superficie, mientras que el efecto sobre el pH perdura en el punto B. Del análisis estadístico de As y metales que se presenta en los siguientes apartados se puede deducir que respecto al factor "Muestreo" y respecto a la interacción "Muestreo*Profundidad" (este último factor no se muestra en las tablas estadísticas) no existieron diferencias significativas en la concentración de los elementos traza, por lo que el cambio de pH en el muestreo 4 en el punto A no produjo cambios en la concentración de elementos con respecto a los anteriores muestreos.

En el tratamiento 'Fe+RP', una posible bajada de pH producido por el sulfato ferroso estuvo contrarrestada por el efecto encalante del residuo de papelería, obteniéndose valores de pH significativamente similares a los del tratamiento 'RP'. Al igual que los cationes metálicos, los protones liberados por la reacción de Fe^{2+} con el agua pueden retenerse sobre las partículas cargadas negativamente del suelo, por lo que el pH del suelo disminuyó pero el de la disolución del suelo pudo mantenerse sin superar al del control sin enmienda.

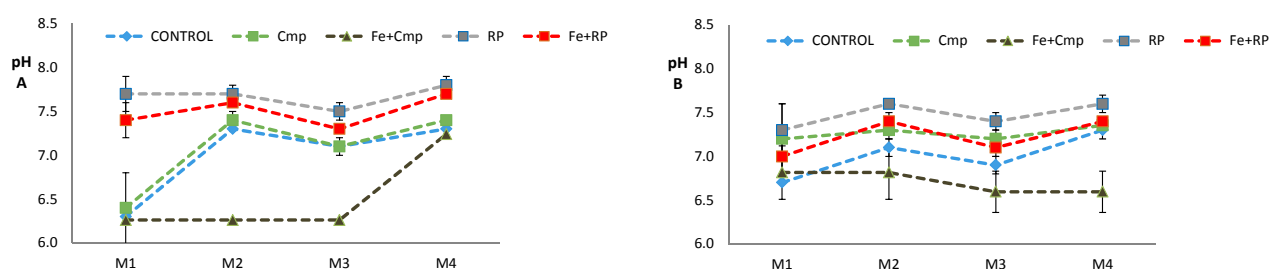


Figura 38. Evolución de los valores de pH de la disolución del suelo en todos los tratamientos: Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO_4 +compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelería: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelería: 'Fe+RP' a dos profundidades, A (en superficie, el gráfico se muestra a la izquierda) y B (a 10 cm de A, el gráfico se muestra a la derecha). M1, M2, M3 y M4: muestreos sucesivos. Se muestra la media \pm ET, n=3 en los casos en los que fue posible extraer la disolución del suelo de cada una de las tres sondas por altura.

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

Tabla 56. Estadística asociada a la Figura 38 del pH. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos considerando todos los muestreos. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO₄+compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO₄+residuo de papelera: 'Fe+RP'. P<0,05.

ANOVA		Comparaciones Post hoc	
Tratamiento	<0,001	Control	b
Muestreo	<0,01	'Cmp'	b
Profundidad	n.s	'Fe+Cmp'	c
Tratamiento*Muestreo	n.s	'RP'	a
		'Fe+RP'	ab

Arsénico

Al igual que la concentración de As extraída con sulfato amónico, la concentración de As de la disolución del suelo disminuyó en los tratamientos 'Fe+Cmp' y 'Fe+RP' en comparación con el control y aumentó significativamente en el tratamiento 'RP', mientras que no existieron diferencias significativas entre el control y el tratamiento 'Cmp' (Figura 39, Tabla 57). Los resultados muestran la existencia de una correlación entre los dos métodos de extracción de As aplicados en este capítulo, en donde se puede observar la misma tendencia, confirmada con el análisis de componentes principales del siguiente apartado (Tabla 45 y Figura 62). Los resultados obtenidos de la disolución del suelo presentaron en algunos casos una gran variabilidad, que no fue tan marcada en el ensayo en mesocosmos con enmiendas donde se utilizaron las mismas sondas de succión. Además, debido al pH de la disolución del suelo en este ensayo, la concentración de As extraída con las sondas en el ensayo en mesocosmos (Capítulo IV.2) fue inferior a la de este ensayo en macrocosmos, confirmando que el As lábil aumenta cuanto mayor es el valor de pH (O'Neill, 1990).

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

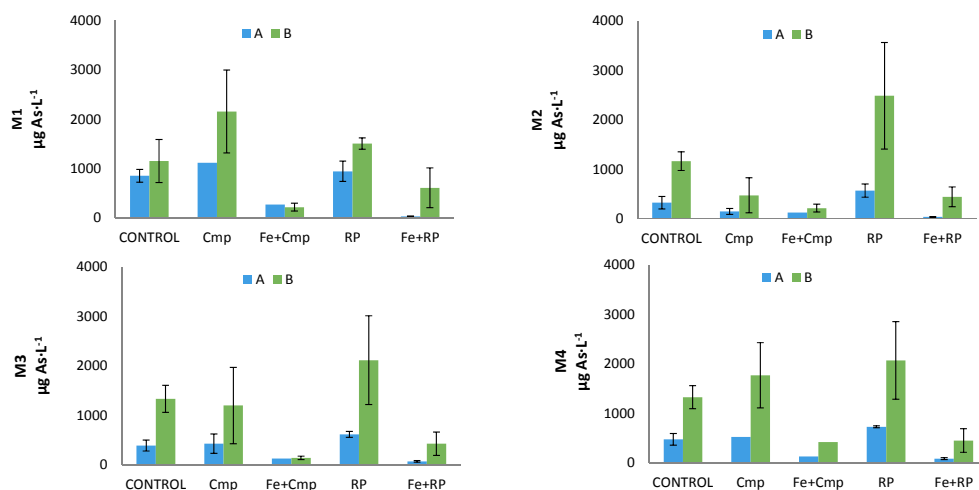


Figura 39. Concentración de As en la disolución del suelo en todos los tratamientos: Control; Cmp; Fe+Cmp; RP, Fe+RP. Cada gráfico corresponde a un muestreo, siendo la evolución la siguiente: M1, M2, M3 y M4. Se muestra la media \pm ET, $n=3$ en los casos en los que fue posible extraer la disolución del suelo de cada una de las tres sondas por altura: A en superficie; y B a 10 cm de la sonda del punto A.

Tabla 57. Estadística asociada a la Figura 39 de la concentración de As de la disolución del suelo. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos considerando las dos Profundidades. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO_4 +compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelera: 'Fe+RP'. $P<0,05$.

ANOVA		Comparaciones Post hoc	
Tratamiento	<0,001	Control	b
Muestreo	n.s	'Cmp'	ab
Profundidad	<0,001	'Fe+Cmp'	c
Tratamiento*Profundidad	<0,01	'RP'	a
		'Fe+RP'	c

Salvo los muestreos de la disolución del suelo en superficie en el tratamiento 'Fe+RP', los niveles de As superaron ampliamente el límite recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecido en $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, de manera similar que ocurría en el ensayo en tiestos (Capítulo IV.2). En este tratamiento, a pesar de esta reducción en superficie, en el punto B las concentraciones de As fueron dos órdenes de magnitud superior a las del punto de muestreo A. Esto ocurría también en los demás tratamientos en mayor o menor grado, hasta 4 veces superior en el punto de muestreo B que en A. No existieron diferencias entre los valores de pH entre los puntos A y B de la disolución del suelo (Tabla 56). La movilización de As desde la superficie,

favorecida por el pH y por el desplazamiento de partículas con carga desde la superficie hacia el fondo, ha determinado que la concentración de As en B sea superior.

La retención de As en el tratamiento 'Fe+RP' y 'Fe+Cmp' fue efectiva en comparación con el resto de tratamientos, gracias a la formación de óxi-hidróxidos de hierro. No se alcanzaron valores de pH suficientemente elevados como para causar la movilización de As como se observó en los ensayos con columnas de lixiviación, o al menos el efecto de las enmiendas se mantiene, sobre todo en 'Fe+RP', sin descartar posibles modificaciones.

La incorporación de enmiendas de Fe favorece la retención de As pero al disolverse produce protones provocando un efecto movilizador de metales. Este hecho supone un reto para la remediación de suelos multicontaminados, puesto que el aporte de ciertas enmiendas contribuyen tanto a la solubilización de unos elementos como a la disminución de la movilización de otros, como es el caso de metales y arsénico. El aporte de enmiendas de hierro, en las proporciones añadidas y en combinación con materiales orgánicos como este compost, puede ser de gran utilidad porque no supuso una bajada importante de pH de la solución del suelo (que se mantiene entre 6,3 y 6,8) como la que se hubiera producido con el sulfato ferroso solo (Capítulo IV.1 y IV.2). Además, el Fe, como se muestra en la Figura 42, no se moviliza, puesto que al pH de la disolución del suelo el Fe no se encuentra soluble, al igual que ocurría en el ensayo con columnas de lixiviación en el tratamiento 'Fe+Ca', reteniendo Fe en el suelo y contribuyendo a la formación de complejos de As y Fe, como pueden ser los complejos amorfos de arseniato férrico (Carlson et al., 2002).

Los tratamientos 'Cmp' y 'RP' contienen materia orgánica. Se sabe que la fracción más soluble de la materia orgánica, los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, pueden moverse conjuntamente con el As (Clemente et al., 2008). También se ha demostrado la existencia de una competencia entre el As y sustancias orgánicas cargadas negativamente por su adsorción en el suelo, por ejemplo sobre los óxidos de Fe (Lin et al., 2008). Ambos procesos pueden ocurrir en el suelo, de manera que existe cierta controversia en cuanto a la relación entre el As y la materia orgánica y el papel de ésta en procesos de estabilización de la contaminación. El hecho de que el As en la disolución del suelo aumente con la aplicación única de compost y residuo de papelería, pero no en 'Fe+Cmp' y 'Fe+RP', sugiere que el efecto del sulfato de hierro sobre la inmovilización del As es superior al de los materiales orgánicos, y son el residuo de papelería y el compost los que ayudan a la subida de pH y al mantenimiento del mismo respectivamente.

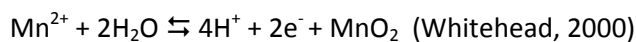
En el análisis de especiación de As de la disolución del suelo no se observó la presencia de As (III). No se muestran debido a la ausencia de As (III), pero se obtuvo una recuperación entre el 68 y el 103% de arseniato. La oxidación de la materia orgánica puede llevar a la reducción de

As(V) a As(III), de manera que la movilización de arsenito, al ser más móvil, podría determinar que en los tratamientos 'RP' y 'Cmp' la mayor movilización de As se debiera a esto. Sin embargo los datos muestran que el arseniato fue la única especie de As encontrada y por tanto el aumento del As en la disolución del suelo estuvo principalmente controlado por el efecto del pH. Por tanto, la aireación de los suelos y un correcto drenaje de los mismos no permitió la reducción de arseniato por cambios en las condiciones redox del suelo.

Con todos los datos a nuestra disposición, es necesario destacar la importancia de combinar compuestos de hierro con otros materiales. Como en este apartado se demuestra, la combinación con materiales orgánicos, compost y residuo de papelería, este último con capacidad encalante, ayuda a la retención de As y al mantenimiento del pH inicial. Tanto en suelos ligeramente básicos, como en los suelos ácidos ensayados en columnas de lixiviación y en mesocosmos, se requiere la incorporación de materiales que aseguren la formación de minerales de hierro para retener arsénico en el suelo. Además, se debe contrarrestar la bajada de pH que conlleva su aporte con un material encalante. En los ensayos con columnas de lixiviación, donde el pH inicial era ácido, la combinación de sulfato ferroso con residuo de papelería fue la más efectiva en la inmovilización de As a corto plazo. En este ensayo en macrocosmos, al tratar con un suelo original ligeramente básico, incluso las mezclas con compost ácido proporcionaron buenos resultados en comparación con el control.

Metales

La concentración de Mn (Figura 40) sólo se modificó con respecto al control en el tratamiento 'Fe+Cmp', el tratamiento de pH más bajo, donde aumentó significativamente en comparación con todos los demás tratamientos, al igual que se encontró con el método de extracción con sulfato amónico. A diferencia del As, no se observó un patrón claro de la movilización de Mn en el intervalo del perfil del suelo seleccionado (no existieron diferencias significativas de la interacción Tratamientos*Profundidad, Tabla 58). El Mn es un elemento muy susceptible a cambios redox y de pH. La disolución del suelo obtenida es la extraída de los macroporos, y aunque éstos permiten el drenaje tras su saturación, no se puede garantizar la uniformidad del potencial redox en todos ellos y en zonas cercanas a microporos y/o durante la saturación de los macroporos con el riego. La solubilidad de Mn en sistemas con un pH cercano a la neutralidad y en condiciones que favorecen la aireación del suelo es inferior que en suelos ácidos. El equilibrio tiende a desplazarse hacia la formación de Mn(III) y Mn(IV) que pueden formar óxidos e hidróxidos de baja solubilidad, según el equilibrio siguiente:



En suelos como los del tratamiento 'Fe+Cmp' el equilibrio se podría desplazar hacia la izquierda posibilitando que el Mn estuviera más disponible.

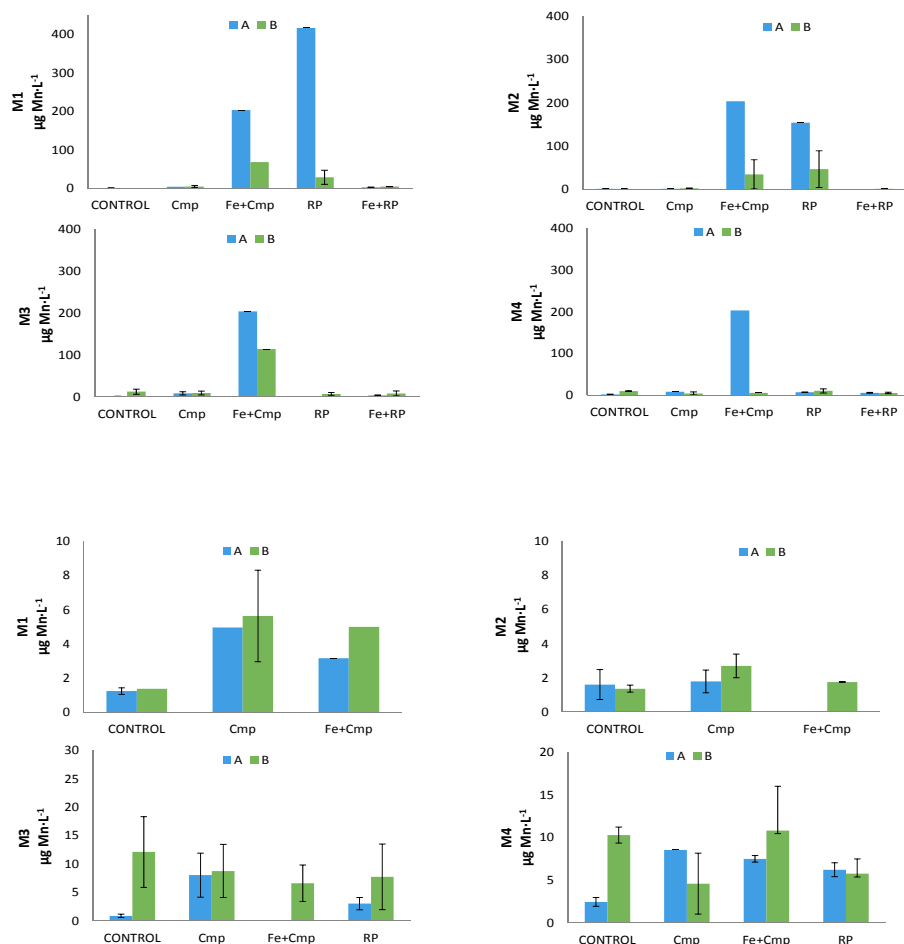


Figura 40. Concentración de Mn en la disolución del suelo en todos los tratamientos. Las cuatro primeras figuras presentan todos los tratamientos Control; Cmp; Fe+Cmp; RP, Fe+RP en este orden. En las seis siguientes aparece eliminado el tratamiento 'RP' para observar mejor las diferencias entre los otros. Cada gráfico corresponde a un muestreo, siendo la evolución la siguiente: M1, M2, M3 y M4. Se muestra la media ± ET, n=3 en los casos en los que fue posible extraer la disolución del suelo de cada una de las tres sondas por altura: A en superficie; y B a 10 cm de la sonda del punto A.

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

Tabla 58. Estadística asociada a la Figura 40 de la concentración de Mn. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos considerando las dos alturas. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO₄+compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO₄+residuo de papelera: 'Fe+RP'. P<0,05.

ANOVA		Comparaciones Post hoc	
Tratamiento	<0,01	Control	b
Muestreo	n.s	'Cmp'	b
Profundidad	<0,01	'Fe+Cmp'	a
Tratamiento*Profundidad	n.s	'RP'	ab
		'Fe+RP'	b

A diferencia de As y Mn, no hubo diferencias significativas en la concentración de Zn entre los puntos A y B (Figura 41, Tabla 59). Considerando el Zn extraído con sulfato amónico, el tratamiento 'Fe+Cmp' fue el que más Zn movilizó. En cambio, considerando la extracción con las sondas de succión, 'Fe+Cmp' no aumentó la concentración de Zn soluble con respecto al control. Hay que tener en cuenta que la extracción con sulfato amónico corresponde a las fracciones solubles más la intercambiable, mientras que con las sondas de succión solamente se extrae la fracción soluble. Los posibles complejos de Zn formado con la materia orgánica podrían no atravesar la cápsula cerámica de las sondas, o bien, quedar retenidos en el filtrado previo al análisis de las muestras.

Se analizó la concentración de Cd en la disolución del suelo, y no superó 1 µg·L⁻¹ (datos no mostrados) siendo en la mayoría de los casos inferior al límite de detección. Consecuentemente, parece que la extracción con sulfato amónico ha podido sobrestimar la concentración de Cd disuelto para las plantas y otros organismos presentes en el suelo.

La concentración soluble de Fe, no presentó diferencias significativas entre tratamientos, muestreos o puntos de recogida de la solución del suelo (Figura 42, P<0,05), y aunque se añadió hierro en forma de sulfato ferroso, la solubilidad de Fe a los valores de pH del suelo se mantuvo baja.

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

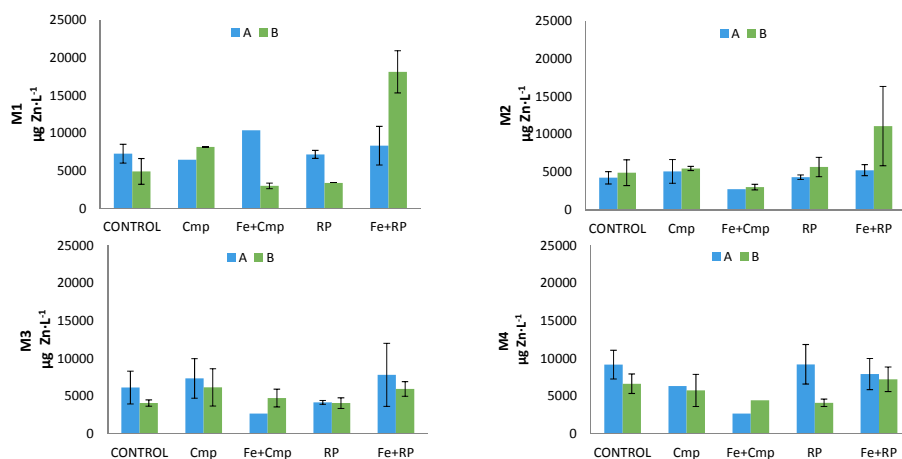


Figura 41. Concentración de Zn en la disolución del suelo en todos los tratamientos: Control; Cmp; Fe+Cmp; RP, Fe+RP. Cada gráfico corresponde a un muestreo, siendo la evolución la siguiente: M1, M2, M3 y M4. Se muestra la media \pm ET, $n=3$ en los casos en los que fue posible extraer la disolución del suelo de cada una de las tres sondas por Profundidad: A en superficie; y B a 10 cm de la sonda del punto A.

Tabla 59. Estadística asociada a la Figura 41 de la concentración de Zn. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO₄+compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO₄+residuo de papelera: 'Fe+RP'. $P<0,05$.

ANOVA		Comparaciones Post hoc	
Tratamiento	<0,01	Control	ab
Muestreo	n.s	'Cmp'	ab
Profundidad	n.s	'Fe+Cmp'	b
		'RP'	b
		'Fe+RP'	a

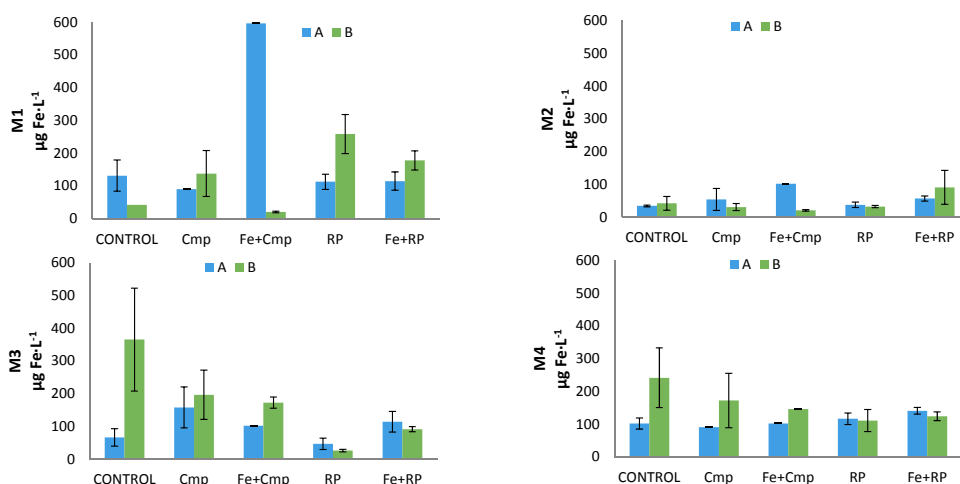


Figura 42. Concentración de Fe en la disolución del suelo en todos los tratamientos: Control; Cmp; Fe+Cmp; RP, Fe+RP. Cada gráfico corresponde a un muestreo, siendo la evolución la siguiente: M1, M2, M3 y M4. Se muestra la media \pm ET, $n=3$ en los casos en los que fue posible extraer la disolución del suelo de cada una de las tres sondas por altura: A en superficie; y B a 10 cm de la sonda del punto A.

3.3 Biomasa y concentración de elementos en planta. Relación con la concentración de elementos en el suelo y en la disolución del suelo.

Durante los nueve meses de cultivo, el crecimiento de la parte aérea de ambas especies se fue claramente diferenciando una de la otra, tanto en la cantidad de biomasa (Tabla 60) como en el tipo de crecimiento. Las plantas de *A. elatius* desarrollaron unas macollas más densas que las de *F. curvifolia* (Figuras 7). La biomasa de la raíz extraída puede no ser representativa del crecimiento real de las plantas, ante la dificultad que supuso su total extracción del suelo. Sin embargo, los valores indican también un mayor desarrollo de la biomasa de la raíz de *A. elatius*. Por tanto, *A. elatius* subps Bulbosum puede ser una buena candidata en programas de fitorremediación dada su alta producción de biomasa y su capacidad de extensión en el suelo, también registrada en otros trabajos al igual que se observó en el Capítulo IV.2 (Deram et al., 2007; Tůma et al., 2009). La combinación de ambas especies vegetales sería una opción coherente, puesto que ambas coexisten en la mina y desarrollan raíces fasciculadas que se extienden y contribuyen fácilmente a fijar el suelo.

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

Tabla 60. Peso fresco (g) de la parte aérea y de la raíz de *A. elatius* y *F. curvifolia* al final del ensayo en cada uno de los tratamientos. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO_4 +compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelería: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelería: 'Fe+RP'.

Tratamiento	<i>A. elatius</i>		<i>F. curvifolia</i>	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
Control	68	12,5	8,8	3,3
'Cmp'	123,4	5,52	4,83	2,55
'Fe+Cmp'	323,7	9,7	9,64	9,0
'RP'	75,5	11,2	3,41	1,6
'Fe+RP'	72,2	4,5	3,4	1,8

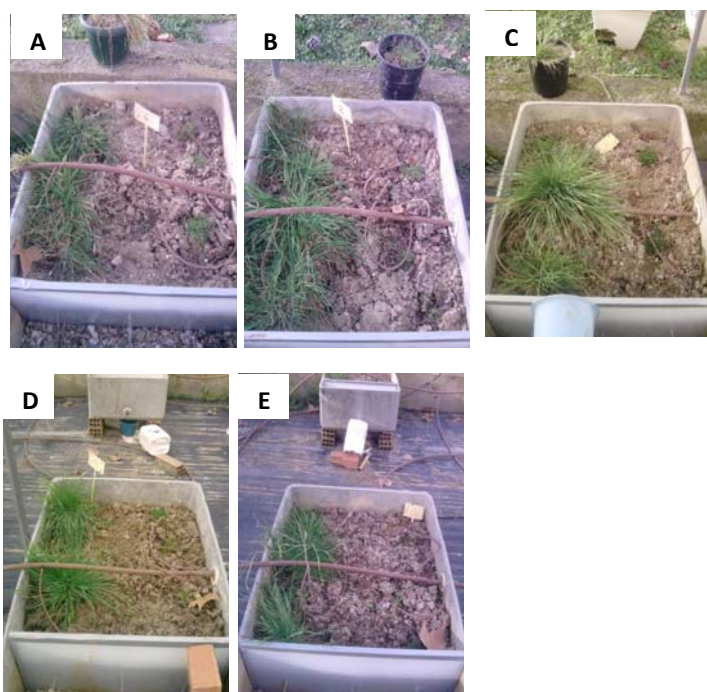


Figura 43. Contenedores correspondientes al control (A), 'Cmp' (B), 'Fe+Cmp' (C), RP (D) y 'Fe+RP' (E). Fotografía tomada seis meses después de la siembra.

Las correlaciones entre la biomasa de las plantas y el pH del suelo fue negativa (coeficientes de Pearson: parte aérea de *A. elatius* con pH: -0,871**; parte aérea de *F. curvifolia* y pH: -0,850**, **significativo a $P < 0,001$). Sin tener en cuenta la concentración de elementos traza en el suelo, los tratamientos con valores de pH del suelo próximos a 8 no mejoraron la

producción de biomasa en comparación con el control y tampoco con respecto al tratamiento 'Fe+Cmp'.

A continuación se muestran los resultados de concentración de As, Cu, Mn y Zn en planta (Figura 44). La concentración de Cd se encontró por debajo del límite de detección para las dos especies vegetales.

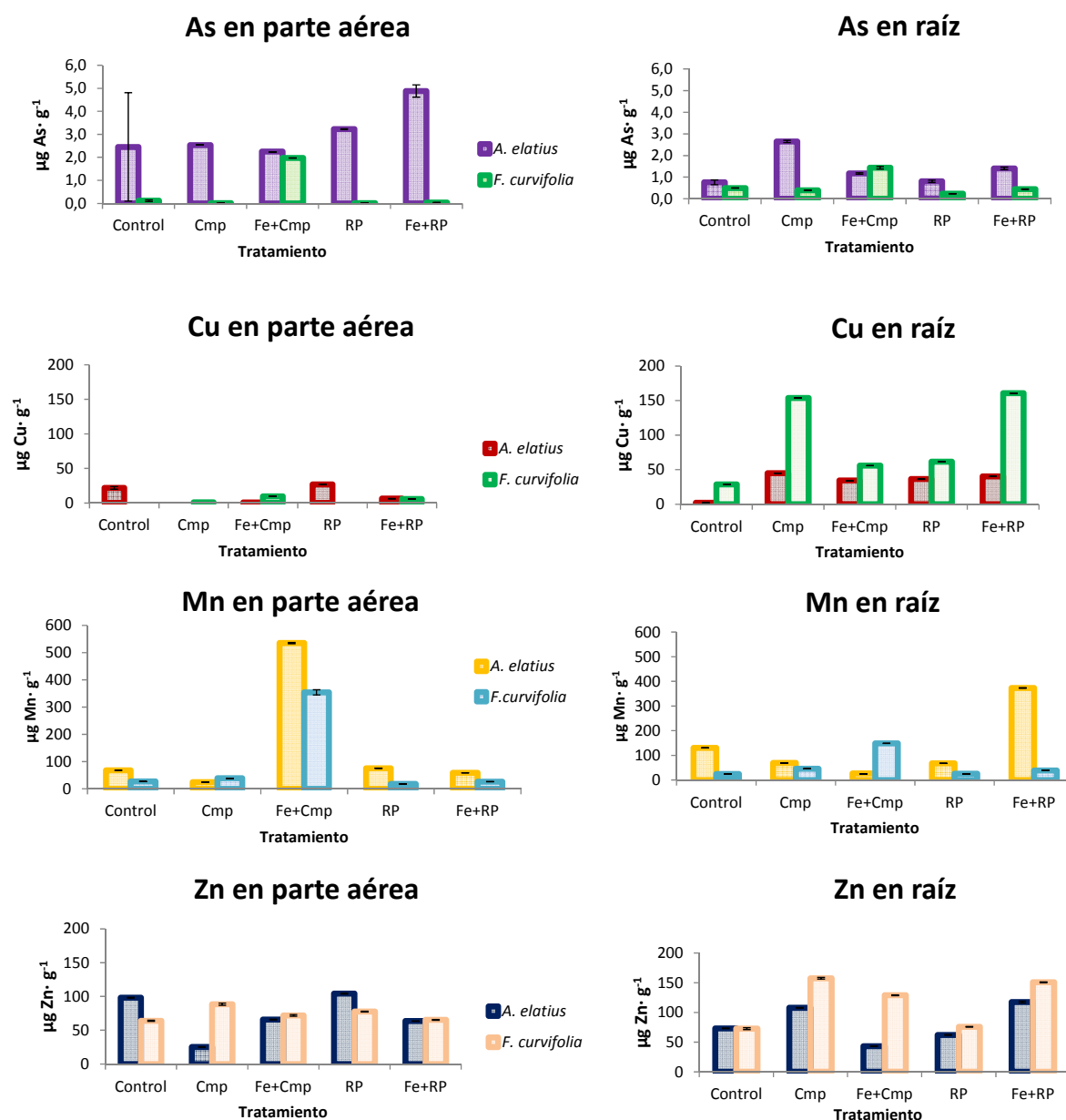


Figura 44. Concentración de As, Cu, Mn y Zn en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ en la parte aérea y raíz de *A. elatius* y *F. curvifolia*. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO_4 +compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO_4 +residuo de papelera: 'Fe+RP'.

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

Tabla 61. Acumulación de As en la parte aérea de *A. elatius* y *F. curvifolia*. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO₄+compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelera: 'RP'; FeSO₄+residuo de papelera: 'Fe+RP'.

Tratamiento	μg As·planta ⁻¹	
	<i>A. elatius</i>	<i>F. curvifolia</i>
Control	36,6	0,2
'Cmp'	118,9	0,0
'Fe+Cmp'	160,1	4,2
'RP'	53,6	0,0
'Fe+RP'	77,5	0,0

La acumulación de As se muestra para las partes aéreas de ambas especies vegetales (Tabla 61). Fue más elevada en *A. elatius* que en *F. curvifolia*, dado la mayor absorción de As y el mayor desarrollo de la parte aérea.

Se ha realizado un análisis de componentes principales con las siguientes variables (Figura 45, Tabla 62): concentración de As, Cu, Mn y Zn en raíz y en parte aérea de *A. elatius* y *F. curvifolia*, concentraciones de As, Cu, Mn y Zn en suelo extraídas con sulfato amónico, concentración de As, Mn y Zn en la disolución del suelo en los puntos A y B del muestreo 4 (puesto que no existieron diferencias significativas entre muestreos, Tablas 57-59), pH del suelo, pH de la disolución del suelo del muestreo 4 en los puntos A y B (no existieron diferencias significativas en la interacción Tratamiento*Muestreo), materia orgánica y biomasa de las dos especies. En total 32 variables han sido reducidas a dos componentes principales (Tabla 62). Mediante el análisis de componentes principales se puede determinar qué variables están correlacionadas entre sí, resaltando la correlación entre elemento extraíble/soluble y elemento en planta y entre elemento extraíble con sulfato amónico y con las sondas de succión.

Se pudo determinar la existencia de una correlación entre el As extraído con sulfato amónico y el de la disolución del suelo. También para el Mn en superficie (punto A), pero no para el Zn. Por tanto, la información que proporcionan ambos métodos para la determinación de la concentración de As y Mn más fácilmente disponible fue similar y podremos usar uno u otro en función de las condiciones de nuestro ensayo.

En el capítulo anterior no se encontró un patrón claro de la relación entre la disponibilidad/solubilidad de elementos traza y su absorción por las plantas. Sólo se disponía de la parte aérea, por lo que en este ensayo se muestreó también la raíz para obtener información adicional sobre la absorción de elementos traza, sobre todo de As y Cd por considerarse no esenciales. Las únicas correlaciones positivas encontradas entre elemento disponible y/o soluble con el elemento en planta se correspondieron con la concentración de As tanto en suelo con en

la disolución del suelo (en los puntos de muestreo A y B) con la de la parte aérea de *A. elatius*; la concentración de Mn en suelo y en la disolución del suelo en el punto A con la concentración de Mn en raíz y parte aérea de *F. curvifolia* y parte aérea de *A. elatius*; la concentración de Cu extraíble y la concentración de Cu en la raíz de *A. elatius* (Tabla 62). Las demás variables no se correlacionaron y su pertenencia a una u otra componente revela que, como en el anterior ensayo con las mismas herbáceas, no existió un patrón claro en cuando a la absorción de elementos traza y su relación con la concentración de las fracciones más fácilmente disponibles de los elementos.

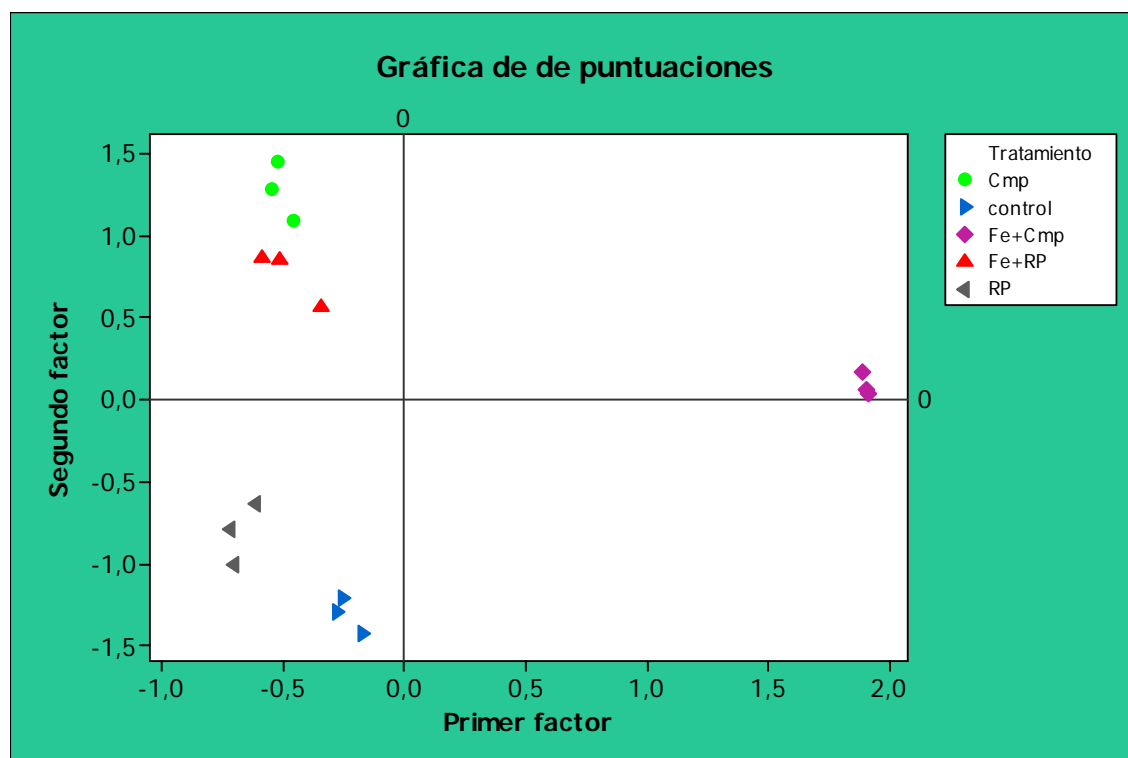
No se observó un efecto claro de las enmiendas sobre la concentración de elementos en planta. Con respecto al As, la absorción aumentó significativamente en las plantas de *F. curvifolia* en el tratamiento 'Fe+Cmp' al encontrarse en la parte más positiva de la primera componente a pesar de que la concentración de As en suelo o en la disolución del suelo estuvieron correlacionadas con el eje negativo de CP1. Una mayor disponibilidad de As en los tratamientos más cercanos al eje negativo de CP1 pudo haber contribuido a una mayor absorción de As por la parte aérea de *A. elatius*, aunque no se reflejó en raíz.

IV. 3 Aplicación de enmiendas a suelos contaminados en ensayos en macrocosmos

Tabla 62. Matriz de los componentes rotados mediante normalización Varimax resultante del análisis de componentes principales (factores de carga) de la concentración de As, Cu, Mn y Zn en las plantas de *A. elatius* y *F. curvifolia*, la concentración de As, Cu, Mn y Zn extraídas con sulfato amónico la concentración de As, Cu, Mn y Zn en la disolución del suelo, la biomasa de las especies vegetales y el pH y la materia orgánica del suelo. Se muestra la varianza explicada por cada componente (en total 70%) y los autovalores de cada componente (Eigenvalues). Ae: *Arrhenaterum elatius*; Fc: *Festuca curvifolia*; PA: parte aérea; M.O: materia orgánica; pH: se corresponde con el valor de pH del suelo; A: punto de muestreo de la disolución del suelo en la superficie; B: punto de muestreo de la disolución del suelo a 10 cm de A; CP1, primera componente principal; CP2, segunda componente principal. n.s: no significativo o correlacionado con otra componente que no aparece puesto que el análisis solo se ha realizado ajustado a dos componentes principales.

Análisis de componentes principales				
	CP1	CP 2	CP 1	CP 2
Ae PA-As	-0,500		As extraíble	-0,707
Ae-raíz-As		0,866	Cu extraíble	0,674
Ae-PA-Cu		-0,848	Mn extraíble	0,988
Ae-raíz-Cu		0,805	Zn extraíble	0,989
Ae-PA-Mn	0,983		As-A	-0,539
Ae-raíz-Mn	-0,402		As-B	-0,481
Ae-PA-Zn		-0,924	Mn-A	0,977
Ae-Raíz-Zn	-0,643	0,623	Mn-B	-0,607
Fc PA-As	0,987		Zn-A	-0,637
Fc-raíz-As	0,808		Zn-B	n.s
Fc-PA-Cu	0,808		MO	0,813
Fc-raíz-Cu		0,873	pH suelo	-0,996
Fc-PA-Mn	0,982		pH A	-0,728
Fc-raíz-Mn	0,963		pH B	-0,986
Fc-PA-Zn		0,511	Biomasa Ae	0,821
Fc-Raíz-Zn		0,971	Biomasa Fc	0,765
			Varianza (%)	46
			Eigenvalue	14,8
				24
				7,6

Figura 45. Gráfico correspondiente a los factores de carga sobre el primer y el segundo factor del análisis de componentes principales de la Tabla 63. Cada tratamiento fue replicado cuatro veces, lo que genera cuatro puntos por tratamientos. Cmp: tratamiento con compost; RP: tratamiento con el residuo de papelería; Fe+RP: tratamiento con FeSO_4 y residuo de papelería; Fe+Cmp: tratamiento con FeSO_4 y compost; Control: tratamiento sin enmienda.



La absorción depende de la especie y no solo de la biodisponibilidad de los elementos en el suelo. Se ha descrito el potencial carácter remediador y fitoextractor de Zn y Cd de las plantas de *A. elatius*, manifestando que especie es pseudo-metalofita (Schwartz et al., 2001; Deram et al., 2007). También se ha descrito el carácter fitorremediador de Cu, Zn y Ni en fitorremediación asistida mediada por el aporte al suelo de EDTA, (Deram et al., 2000). Incluso se han estudiado las variaciones estacionales que experimentan plantas de *A. elatius* en su capacidad de absorción y en la translocación de elementos de la raíz a la parte aérea. Por ejemplo, para el Cd, la translocación puede disminuir durante la época de producción de semillas (junio) por lo que sería aconsejable recogerlas en marzo cuando la acumulación de Cd en parte aérea es máxima (Deram et al., 2007). En las plantas de *A. elatius* del presente estudio, la concentración de Zn es muy baja comparada con plantas hiperacumuladoras de este elemento. Según Brooks (1998), una especie se considera hiperacumuladora de Zn cuando la concentración supera $10.000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en la parte aérea. A pesar de que el ratio de Zn de la parte aérea a la raíz haya sido en algunos tratamientos superior a 1 (Tabla 63), esta especie no se considera acumuladora de Zn, ni tampoco de Cd, como apuntaban los anteriores estudios (la concentración de Cd en planta fue

inferior al límite de detección). Hay que subrayar que los suelos con los que tratamos poseen un pH ligeramente básico, contribuyendo a una menor solubilidad de Cd y por tanto restringiendo desde el suelo su absorción por la planta. Estos resultados concuerdan con los del Capítulo IV.2 con tiestos y enmiendas, en el que las mismas especies vegetales no absorbieron Cd a pesar de la mayor disponibilidad de este elemento. Además, la concentración de Zn alcanzada en *A. elatius* en los ensayos en mesocosmos, donde el pH fue más bajo, fue del mismo orden que en este ensayo. Todo apunta a que la concentración normal de Zn en parte aérea sea próxima a la encontrada, aunque otros estudios han presentado concentraciones de Zn en la parte aérea de poblaciones no metalíferas de *A. elatius* 10 veces superiores (Deram et al., 2007). Las diferencias de absorción entre poblaciones ponen de manifiesto que a veces las más expuestas son las más excluidoras. Para verificar este hecho sería necesaria una comparación entre poblaciones no metalíferas y metalíferas. Si tenemos en cuenta que el origen de las semillas es de plantas que crecen en la mina, nuestra población metalífera habría sido capaz de excluir el As de sus tejidos. La concentración de As en raíz y parte aérea de *A. elatius* tampoco es indicativa de acumulación, a pesar de que algunos de los ratios PA/R hayan sido superiores a 1 (Tabla 64). La escasa concentración de As en los tejidos vegetales indica que *A. elatius* no es una planta útil en fitoextracción.

Tabla 63. Ratios de concentración de elementos traza entre la parte aérea y la raíz (PA/R) de las plantas. Control no enmendado; Compost: 'Cmp'; FeSO₄+compost 'Fe+Cmp'; residuo de papelería: 'RP'; FeSO₄+residuo de papelería: 'Fe+RP'.

Ratios PA/R				
<i>A. elatius</i>	As	Cu	Mn	Zn
Control	2,83±2,69	10,87±1,3	0,52±0,004	1,34±0,005
'Cmp'	0,97±0,82	-	0,36±0,001	0,23±0,003
'Fe+Cmp'	0,93±0,93	0,02±0,003	20,3±0,10	1,52±0,008
'RP'	3,99±0,24	0,74±0,005	1,11±0,004	1,68±0,02
'Fe+RP'	3,48±0,05	0,15±0,008	0,16±0,0007	0,54±0,005
<i>F. curifolia</i>	As	Cu	Mn	Zn
Control	0,23±0,07	-	1,14±0,006	0,88±0,008
'Cmp'	0,01±0,006	0,01±0,005	0,85±0,0006	0,56±0,006
'Fe+Cmp'	1,43±0,003	0,17±0,003	2,38±0,06	0,56±0,009
'RP'	0,02±0,02	-	0,69±0,007	1,03±0,01
'Fe+RP'	0,04±0,04	0,04±0,008	0,69±0,003	0,43±0,002

En cuanto a la biomasa, es el tratamiento 'Fe+Cmp' el que más favoreció el crecimiento vegetal. Otros factores pudieron influir sobre el desarrollo de la biomasa además del pH, como la concentración de elementos contaminantes. La parte aérea de ambas especies estuvieron positivamente correlacionadas con la concentración extraíble de Zn y Mn, considerados micronutrientes y por tanto necesarios para un mejor desarrollo vegetal. El aumento de la cantidad de materia orgánica del tratamiento 'Fe+Cmp' favoreció el crecimiento vegetal, pero no fue así en el tratamiento 'Cmp', en el que también el contenido de materia orgánica fue significativamente superior que en el control. La concentración disponible y soluble de As estuvo correlacionada negativamente con la biomasa de la parte aérea de *A. elatius* y *F. curvifolia*, indicando que una mayor concentración disponible de este elemento perjudica a la producción vegetal. Por tanto, un pH adecuado (inferior al rango 7-8) junto con un contenido apropiado de materia orgánica y nutrientes y niveles bajos de As, todo ello propio del tratamiento 'Fe+Cmp', favorece el crecimiento de las dos especies *A. elatius* y *F. curvifolia*. En cambio, un pH superior a 7-8 y concentraciones de As disponible más elevadas, a pesar del aumento de materia orgánica en el tratamiento 'Cmp', no permitieron un desarrollo vegetal como el del tratamiento 'Fe+Cmp'. Por otro lado, como se ha mencionado, la concentración de As en *F. curvifolia* y la biomasa de esta especie estuvieron correlacionadas positivamente, lo que indica una mayor resistencia al As.

4. CONCLUSIONES

- Se han podido observar correlaciones significativas entre los dos métodos de extracción de las formas más movilizables de As, permitiendo realizar con ambos métodos de extracción (sondas de succión, sulfato amónico) una estimación de la concentración más fácilmente disponible de este elemento para las plantas
- El muestreo a diferentes profundidades permite identificar el riesgo de la movilización de los elementos contaminantes. En los suelos de este ensayo, en los que el pH, tanto en el suelo como en el agua intersticial del suelo, fue ligeramente superior a 7, se observó que la concentración de As aumentaba en el punto de muestreo más alejado de la superficie obteniéndose valores de As superiores al límite establecido por la OMS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- Descartando el aporte único tanto de sulfato ferroso (conclusión obtenida de los ensayos previos), como de compost y de residuo de papelería, en suelos ácidos o neutros (en este caso por el aumento de la solubilidad de As), sería de interés la combinación de una enmienda de hierro junto con otra que ayude a estabilizar la acidez y que permita la retención de los contaminantes catiónicos. En este capítulo se ha observado que la enmienda de sulfato ferroso combinada con compost o residuo de papelería, pero sobre todo con el primero, permitió la reducción significativa de As en el suelo y en la disolución del suelo. Además, la producción de biomasa fue superior que en el resto de tratamientos.
- *Arrhenaterum elatius* es la especie que produjo una mayor cantidad de biomasa. Aunque no se ha observado que esta especie en las condiciones en las que creció refleje una potencial capacidad para extraer As o Cd del suelo, la alta producción de biomasa y su supervivencia son considerados requisitos fundamentales para la revegetación de las escombreras. *Festuca curvifolia* también ha demostrado ser una planta resistente a la contaminación. No es descartable esta especie para el mismo fin que *A. elatius* en una siembra de mayor densidad. Una combinación de las dos especies podría ser interesante en aquellos emplazamientos en los que ambas coexistieran.

4. CONCLUSIONS

- Significant correlations between both extractive methods for the mobile forms of As were observed. This suggests that either of these methods is suitable for estimating the most easily available phases of As for plants in the studied soils
- Sampling at different depths enables risk caused by contaminant migration downwards to be identified. Arsenic concentration in pore water increased with depth, reaching values higher than the recommended levels proposed by the World Health Organisation ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- The application of ferrous sulphate, compost or paper mill individually was ruled out due to the low pH values for the ferrous sulphate and the increase in As leaching for the two latter amendments. A combination of the materials mentioned above is required in order to decrease labile As. Ferrous sulphate with compost or paper mill, but mainly with compost, have been found to reduce As leaching and furthermore, to increase the biomass yield compared to the other treatments
- *Arrhenaterum elatius* was the plant species with the highest biomass yield. Although there was no observed potential to extract As or Cd, its higher growth and survival makes *A. elatius* a good candidate to revegetate mining dumps. *Festuca curvifolia* has also been found to be a species resistant to the soil contamination although its aboveground tissues did not grow and extend within the soil as much as *A. elatius*. A combination of both plant species is an interesting option in those locations where they were found to coexist

CAPÍTULO V

ECOTOXICOLOGÍA

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE LA REMEDIACIÓN MEDIANTE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS. ECOTOXICOLOGÍA

La salud del suelo es la capacidad que tiene para funcionar como un sistema vivo en el ecosistema. Tras un proceso reductor es necesario evaluar el grado de recuperación del suelo mediante parámetros no solo químicos sino biológicos.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La productividad y salud vegetal y animal, el mantenimiento de la calidad del agua y del aire son parámetros que se incluyen dentro de la definición de salud del suelo (Doran y Zeiss, 2000). Solamente a través de la realización de análisis químicos no se obtienen suficientes evidencias de la repercusión de los contaminantes sobre la biota a nivel ecotoxicológico (Fent, 2004). Los bioensayos son el complemento a los análisis químicos, puesto que pueden proporcionar una medida integrada de la biodisponibilidad y de los efectos perjudiciales de los contaminantes en el ecosistema estudiando la matriz tóxica como un todo (Alvarenga et al., 2007).

El objetivo es la evaluación de la remediación de suelos contaminados por arsénico y metales, a los cuales se les han adicionado diferentes enmiendas (Capítulo IV.2), mediante parámetros biológicos. Para el caso específico de los suelos de la mina de arsenopirita en Bustaviejo, se pretende hacer una selección de los bioensayos que proporcionen más información de la mejora de la calidad del suelo con el fin de utilizarlos en futuras experiencias sobre los suelos procedentes de este emplazamiento minero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ensayos enzimáticos

Se han realizado seis ensayos de actividades enzimáticas: deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa ácida, ureasa, proteasa y celulasa. Estos ensayos consisten en la incubación de una muestra de suelo con un sustrato potencialmente degradable y la posterior extracción del producto resultante cuantificado mediante espectrofotometría. La determinación de los análisis enzimáticos fue realizada en suelo refrigerado a 4 °C y tamizado a 2 mm. El contenido de materia seca fue determinado mediante secado en horno mufla a 105 °C durante 48 h hasta pesada constante para expresar la actividad enzimática en términos de peso seco.

Actividad deshidrogenasa

Los suelos (3 g) fueron incubados con 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolio durante 16 h a 25°C en oscuridad. El sustrato de degradación se reduce a trifetilformazán, el cual se extrae con acetona y se determina espectrofotométricamente a 546 nm (Tabatabai, 1994).

Actividad β -glucosidasa

Los suelos (1 g) fueron incubados con p-nitrofenil- β -glucopiranosido durante 1 h a 37 °C. El producto final resultante, p-nitrofenol, fue determinado espectrofotométricamente a 400 nm (Eivazi y Tabatabai, 1988).

Actividad fosfatasa-ácida

Los suelos (1g) fueron incubados con p-nitrofenilfosfato durante 1 h a 37 °C. El producto final resultante, p-nitrofenol, fue determinado espectrofotométricamente a 400 nm (Eivazi y Tabatabai, 1977).

Actividad ureasa

Fue determinada acorde al protocolo descrito por Kandeler y Gerber (1988), según se describe en Alef y Nannipieri (1995a). Se incubaron 5 g suelo con urea durante 2 h a 37 °C. El

nitrógeno liberado (N-NH_4^+) fue extraído con salicilato de Na/NaOH y Na-dicloroisocianuro y determinado espectrofotométricamente a 690 nm.

Actividad proteasa

Fue determinada según el método desarrollado por Ladd y Butler (1972) y descrito en Alef y Nannipieri (1995b). La actividad proteasa fue determinada espectrofotométricamente a 700 nm después de la incubación del suelo con caseinato de Na durante 2 h a 50 °C.

Actividad celulasa

Fue determinada siguiendo el protocolo propuesto por Hope y Burns (1987). Las celulasas son enzimas que degradan la celulosa y liberan azúcares reductores como producto final. El término se refiere a la acción combinada de endo-1,4- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.4), exo- 1,4- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.91) and β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.21) sobre el reactivo de degradación Avicel®, una alfa celulosa despolimerizada y purificada. Los azúcares reductores se determinaron espectrofotométricamente a 520 nm.

2.2 Ensayos de toxicidad aguda directos

2.2.1 Ensayos de mortalidad de *Eisenia fetida*

Estos ensayos han sido realizados de acuerdo con método estandarizado OECD 207 (1984).

Se preparó una mezcla compuesta de suelo de cada tratamiento preparada con cuatro fracciones de cada una de las repeticiones (una por tiesto). La mezcla compuesta se diluyó con el suelo artificial recomendado por la OECD (10% turba, 20% arcilla y 70% arena de cuarzo p/p; pH ajustado entre 6 y 7 con carbonato de calcio): 100, 50, 25, 12,5 y 0% de suelo original (esta última dilución se corresponde con 100% suelo artificial que sirve de control). Previamente se determinó la capacidad de retención de agua para cada suelo y para el suelo artificial y se llevaron al 60% de su capacidad de campo. Se tomaron 400 g de cada tratamiento en sus correspondientes diluciones y se introdujeron en contenedores de plástico (aproximadamente 1 L de capacidad, 190-111 mm). Se seleccionaron 10 organismos adultos de *E. fetida* (cada uno pesando entre 0,2 y 0,4 g) y se depositaron en cada contenedor, se cerraron y se colocaron en cámaras climatizadas a 20 ± 2 °C con luz continua (para asegurar la permanencia de las lombrices

dentro del suelo durante la duración del test). Al cabo de 15 días se llevó a cabo un conteo de los organismos vivos y en los casos en los que fue posible se determinaron los valores de EC_{20} y EC_{50} (concentración de suelo test en % p/p, a la que se puede observar un efecto tóxico sobre el 20 o el 50% de los organismos).



Figura 46. Imágenes del suelo test mezclado con el suelo artificial.

2.2.2 Ensayos de evitación de *Eisenia fetida*

Tras determinar la mortalidad de *E. fetida* se llevaron a cabo los ensayos de evitación en los tratamientos en sus respectivas diluciones en los que los organismos sobrevivieron al ensayo de mortalidad. Estos ensayos han sido realizados de acuerdo al método estandarizado ISO/DIS 17512-1 (2008). El ensayo consiste en el cálculo del porcentaje de organismos que evitan el suelo contaminado y prefieren el suelo control (suelo artificial) tras dos días de exposición. Para ello se dispuso de los mismos contenedores de plástico que en los ensayos de mortalidad. El procedimiento consistió en dividir los contenedores en dos secciones mediante un separador. Una mitad se rellenó con el suelo contaminado en sus respectivas diluciones preparadas como en el ensayo anterior, y la otra mitad siempre con el suelo artificial. El separador se retiró y se introdujeron 10 organismos de *E. fetida* sobre la línea de separación. Los contenedores se colocaron en cámaras climatizadas a 20 ± 2 °C con luz continua. Se usaron cuatro replicados por tratamiento. Tras 48 h, el suelo contaminado y el artificial fueron separados introduciendo el separador y se realizó un conteo de los organismos que se encontraban en cada una de las dos secciones. Se observó hacia donde se dirigía la cabeza de los organismos que se encontraban en la línea de separación para considerarlos pertenecientes a la sección hacia la que se encaminaba. Se considera que se ha obtenido una respuesta significativa de evitación cuando el número de organismos encontrados en el suelo contaminado es significativamente menor que el número de organismos encontrados en el suelo artificial.



Figura 47. A la izquierda se muestra un contenedor con suelo contaminado en la sección izquierda y el suelo artificial en la sección derecha, junto con las lombrices en la línea de separación. A la derecha se muestra la compilación de contenedores en la cámara climatizada.

La evolución de la función hábitat del suelo se determina de acuerdo al método ISO/DIS 17512-1 (2008): se considera que el suelo tiene una función hábitat limitada si más del 80% de los organismos se encuentran en el suelo artificial, lo que indica que ha habido un impacto en su comportamiento. Los cálculos realizados para determinar si la función hábitat ha sido dañada son los siguientes:

$$T \cdot 100 / N$$

Donde T es el número de lombrices encontradas en el suelo test y N el número total (consideramos 100). Si el resultado es inferior a 20, menos del 20% de organismos se encontraron en el momento del conteo en el suelo contaminado, y de acuerdo con el método, la función hábitat ha sido dañada.

Considerando la siguiente formula:

$$\% EV = ((C - T) / N) \cdot 100$$

Donde C es el numero de organismos encontrados en el suelo artificial, T el número de organismos en el suelo test y N el numero total de organismos en el contenedor. El porcentaje de evitación considerando 100 lombrices, 20 de las cuales se encuentran en el suelo test y 80 en el suelo artificial sería igual a 60 ($EV (\%) = (80 - 20) / 100 \cdot 100 = 60$). Por tanto, porcentajes de evitación iguales o superiores a 60 explican que menos del 20% de los organismos están presentes en el suelo contaminado y que por tanto la función hábitat ha sido afectada negativamente.

2.3 Bioensayos de exposición indirecta

Para la realización de estos bioensayos fue necesaria la obtención de lixiviados de los suelos objeto de ensayo. Se preparó una mezcla compuesta de cada tratamiento tomando partes iguales de cada una de las cuatro repeticiones. Cada mezcla compuesta se sometió a agitación durante 24 horas a temperatura ambiente en proporciones 1:10 (peso seco/volumen) suelo:agua miliQ (DIN 38 414-S4, 1984). El lixiviado fue separado mediante centrifugación y filtración a través de filtros de membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm. Paralelamente a la realización de los bioensayos, se analizaron arsénico y metales pesados en los lixiviados mediante TXRF (S2 Picofox, Bruker). También se determinaron P y K disponible en suelo de acuerdo al método Egner–Riehm (Riehm, 1958).

2.3.1 Ensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Estos ensayos se llevan a cabo según el método estandarizado ISO 6341 (1996). Los lixiviados extraídos de los suelos se diluyeron en la matriz llamada agua de dilución (disolución de NaHCO₃, MgSO₄, KCl y CaCl₂ preparada de acuerdo al protocolo ISO 6341, 1996): 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 %v/v de lixiviado procedente de los suelos contaminados. Además se usó un control (100% de agua de dilución). Se usaron cuatro replicados por cada dilución junto con cuatro controles. Se seleccionan cinco organismos jóvenes de *D. magna* entre la tercera y quinta generación y con menos de 24 horas de vida al inicio del test de inmovilización. Se expusieron a 20 mL de solución durante 48 horas (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 20 °C) tras las cuales se determinó el porcentaje de inmovilización comparado con el control. Se calcularon los valores de EC₂₀ y EC₅₀ en los casos en los que fue posible (porcentaje de lixiviado en % v/v para el cual la inmovilización fue del 20 y del 50% de los organismos).

2.3.2 Inhibición de la luminiscencia de *Vibrio fischeri*

La inhibición de la emisión de luz de *V. fischeri* (NRRL B-11177) en contacto con los lixiviados de los suelos ha sido determinada según el método estandarizado ISO 11348-2 (1998). Se utilizaron las mismas diluciones que en los ensayos con *D. magna* (100, 50, 25, 12,5 y 6,25 %v/v de lixiviado) siendo el diluyente en este caso NaCl 2%, además de utilizarlo como control (0% de lixiviado). Se registró la luminiscencia en el momento inicial tras la reactivación de las bacterias, y a los 15 y a los 30 minutos después de la interacción entre las bacterias y los lixiviados. Se usaron dos repeticiones por dilución. El equipo usado fue un Lumistox 300. Cuando

fue posible se determinaron los valores de EC_{20} y EC_{50} (porcentaje de lixiviado en % v/v para el cual la disminución de la luminiscencia fue del 20 y del 50%).



Figura 48. Imagen de los frascos en los que se introducían los organismos de *D. magna* para su exposición con los lixiviados de suelo (izq.) y equipo Lumistox 300 para la determinación de la luminiscencia emitida por *V. fischeri* (dcha.).

2.4 Análisis estadísticos

Los valores de EC_{20} y EC_{50} en los ensayos de inmovilización de *D. magna* fueron calculados con el programa estadístico Minitab 15.0. Los valores de EC_{20} en los ensayos de luminiscencia de *V. fischeri* fueron determinados usando el programa del equipo Lumistox300.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en el ensayo de evitación en dos cámaras se ha realizado con el test *Fischer exact* (Zar, 1999), el cual se basa en la comparación de la respuesta medida vs la respuesta esperada de una situación de no evitación (hipótesis nula H_0). En una situación esperada de no evitación el número de organismos que se encuentran en la sección del suelo test se corresponde con el 50% del número total. En este caso, ninguno de los organismos evita el suelo test y ninguno se dirige hacia el suelo control. Por tanto, la hipótesis nula asume que la mitad de los individuos permanecen en el suelo contaminado y más específicamente H_0 consiste en que el número de animales observado en el suelo test es superior o igual que el número de animales que se espera en ese mismo suelo. El rechazo de la hipótesis nula indica que ha existido una respuesta de evitación y una distribución no uniforme y significativa de los animales entre las dos cámaras.

Con respecto al análisis de los datos obtenidos en los análisis enzimáticos, se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA) en SPSS 15.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto de las enmiendas sobre las actividades enzimáticas

La actividad deshidrogenasa es un índice de la actividad media de la población microbiana, ya que estas enzimas forman parte integral de los microorganismos (Gil-Sotres al., 2005). Su función consiste en la oxidación o reducción de sustratos utilizando coenzimas que actúan como aceptores o donadores de protones y electrones. Esta actividad enzimática ha sido afectada positivamente en todos los tratamientos con enmiendas, sin diferencias significativas entre ellos, excepto con la aplicación de sulfato ferroso ('Fe'), en comparación con los suelos sin enmendar (Figura 49). Además, la proteasa, la enzima que cataliza la hidrólisis de las proteínas a péptidos y aminoácidos (Ladd y Butler, 1972; Alef y Nannipieri, 1995b), respondió positivamente a la aplicación de 'Ca', 'Fe+Ca' y 'Fe+RP'. La actividad de la β -glucosidasa respondió positivamente al tratamiento 'Fe', el cual fue el único tratamiento que incrementó la actividad de esta enzima. Para el resto de las actividades enzimáticas ensayadas (fosfatasa ácida, ureasa y celulasa) las enmiendas tuvieron un efecto negativo o no produjeron incrementos en su actividad.

Se ha realizado un análisis de componentes principales para establecer las relaciones existentes entre las actividades enzimáticas y determinados parámetros biológicos y físico-químicos. Los resultados proporcionarán información sobre las propiedades del suelo que han sido afectadas por los tratamientos y que han provocado un efecto positivo o negativo sobre las actividades enzimáticas del suelo (Tabla 64).

Mediante el análisis de componentes principales se han reducido 15 variables en dos componentes principales (primera componente, CP1; segunda componente, CP2): crecimiento vegetal (peso fresco de *A. elatius* y *F. curvifolia*), pH del suelo, concentración de As, Cu, Mn y Zn extraídos con sulfato amónico 0,1 M (Tabla 65), P y K disponible y las actividades deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa ácida, ureasa, proteasa y celulasa. No se observaron diferencias significativas en la concentración total en suelo de As, Cu, Mn y Zn ni en el porcentaje de materia orgánica en suelo entre tratamientos al final del ensayo, por lo que no se incluyeron en el análisis de componentes principales.

Las dos componentes explicaron el 60 y el 15% de la varianza respectivamente, por lo que ambas juntas pudieron explicar el 75% del total de la varianza (Tabla 64). La biomasa de ambas especies vegetales, el pH del suelo, P, K disponible, As extraíble y la actividad deshidrogenasa tuvieron coeficientes positivos sobre el primer factor, mientras que la actividad β -glucosidasa, Cu, Mn y Zn extraíble tuvieron coeficientes negativos. Las actividades fosfatasa ácida, celulasa y

ureasa se correlacionaron positivamente con el segundo factor y la actividad proteasa se correlacionó negativamente (Tabla 64).

En la Figura 50 se presenta el gráfico de puntuaciones de todas las variables sobre las dos componentes. Los tratamientos 'Ca', 'RP' y 'Fe+Ca' se localizaron en la parte más positiva de la primera componente, indicando que su aplicación contribuyó al aumento de las propiedades que poseen una elevada correlación con esta parte del eje (actividad deshidrogenasa, pH del suelo, P, K, As y crecimiento vegetal). El tratamiento 'Fe' se localizó en la parte más negativa del eje de la primera componente, indicando que tuvo una respuesta opuesta a la de los otros tratamientos mencionados, reduciendo el pH del suelo, P y K disponible, As extraíble, crecimiento vegetal, aumentando la extractabilidad de metales y actuando en detrimento de la actividad deshidrogenasa. El efecto negativo de los metales sobre la actividad deshidrogenasa es un hecho confirmado en otros estudios, como el efecto del Cd y Zn (Obbard, 2001; Perez de Mora et al., 2005). El efecto sobre la actividad deshidrogenasa puede estar relacionado no sólo con la reducción de la actividad metabólica sino también con una inhibición del crecimiento microbiano (Bååth et al., 1989).

El crecimiento vegetal aumentó con las enmiendas que contribuyeron a subir el pH del suelo (Figura 50, CP1). La biomasa vegetal puede crear condiciones favorables para la actividad microbiana. Alvarenga et al. (2009) subrayaron que la actividad enzimática del suelo podía mejorar con la presencia de plantas, aunque no se podía asumir un efecto concomitante de la producción vegetal. En este trabajo solamente una actividad enzimática estuvo positivamente correlacionada con la biomasa vegetal. Como se esperaba, el aumento de la concentración de P y K disponibles en suelo resultó ser beneficioso para el crecimiento vegetal.

La enzima β -glucosidasa es una enzima extracelular del ciclo del C y participa en la mineralización de la materia orgánica. El aumento de la fracción extraíble de Cu, Mn y Zn (en los suelos sin enmendar, 'Fe' y 'Fe+RP') no disminuyó la actividad β -glucosidasa, puesto que todas las variables se correlacionaron con la parte negativa del eje de la primera componente. El comportamiento opuesto se encontró en 'Ca', 'Fe+Ca' y 'RP', indicando que los tratamientos que subieron el pH del suelo y en los que se encontró una mayor concentración de As extraíble redujeron la actividad de la β -glucosidasa. El aumento de la actividad β -glucosidasa al añadir una fuente de hierro coincide con otros trabajos. Mench et al. (2006) mostraron una recuperación de la actividad β -glucosidasa sobre el control después de 7 años de la incorporación de hierro laminado y Koo et al. (2012) también registraron un aumento con el aporte de sulfato ferroso y hierro laminado por separado. Sin embargo otros autores manifiestan que la presencia de

metales puede afectar negativamente a las actividades enzimáticas, como el Cu sobre la actividad β -glucosidasa y celulasa (Geiger et al., 1998).

Las actividades ureasa, celulasa y fosfatasa ácida estuvieron afectadas negativamente en los tratamientos 'Ca' y 'Fe', puesto que ambos tratamientos aparecen en la parte más negativa de la segunda componente. Los tratamientos 'RP' y 'Fe+RP' se encontraron en la parte más positiva del eje de la segunda componente, muy cerca del tratamiento no enmendado. Estos tres tratamientos mejoraron las actividades ureasa, celulasa y fosfatasa ácida con respecto a los demás tratamientos con enmienda. Cuando el FeSO_4 fue añadido en combinación con el CaCO_3 o el residuo de papelería ('Fe+Ca' y 'Fe+RP'), estas actividades enzimáticas fueron parcialmente recuperadas en comparación con el tratamiento en el que solo se añadió FeSO_4 . Estos efectos pueden ser atribuidos a los cambios en la concentración de elementos traza derivados del aumento del pH cuando el sulfato ferroso se combinó con materiales encalantes. Sin embargo, debido a que estas enzimas se correlacionaron con CP2, pero no con CP1, no se han podido deducir efectos claros del pH del suelo y de los metales y arsénico extraíbles sobre sus actividades. Consecuentemente, estas tres enzimas proporcionan menos información sobre el efecto de los contaminantes en la salud del suelo. Además, el factor de carga de la actividad ureasa fue el más bajo de los correlacionados con la componente CP2 (Tabla 64), lo cual puede ser atribuido a que los tratamientos afectaron en menor medida a la actividad de esta enzima. Hay que considerar que el efecto del tratamiento 'Fe+RP' sobre las actividades deshidrogenasa y proteasa no ha sido tan bueno como el observado en la Figura 49, lo cual puede ser explicado por un mayor error típico de los datos en comparación con el resto de tratamientos.

Con respecto a la actividad proteasa, el factor de carga correspondiente a esta enzima fue el menor de entre todas las actividades enzimáticas, indicando que podría haberse correlacionado mejor con una tercera componente. Por tanto, la correlación con los otros parámetros no se considera significativa.

Considerando que la actividad deshidrogenasa se correlacionó positiva y significativamente con el crecimiento vegetal y con ciertos nutrientes como P y K, esta actividad metabólica será seleccionada como indicadora del progreso de la actividad remediadora en ensayos subsiguientes. Esta conclusión está en consonancia con otros trabajos, en los se indica que la actividad deshidrogenasa fue mejor indicador del progreso de la remediación de un suelo que otras actividades enzimáticas (Perez de Mora et al., 2005, 2006b).

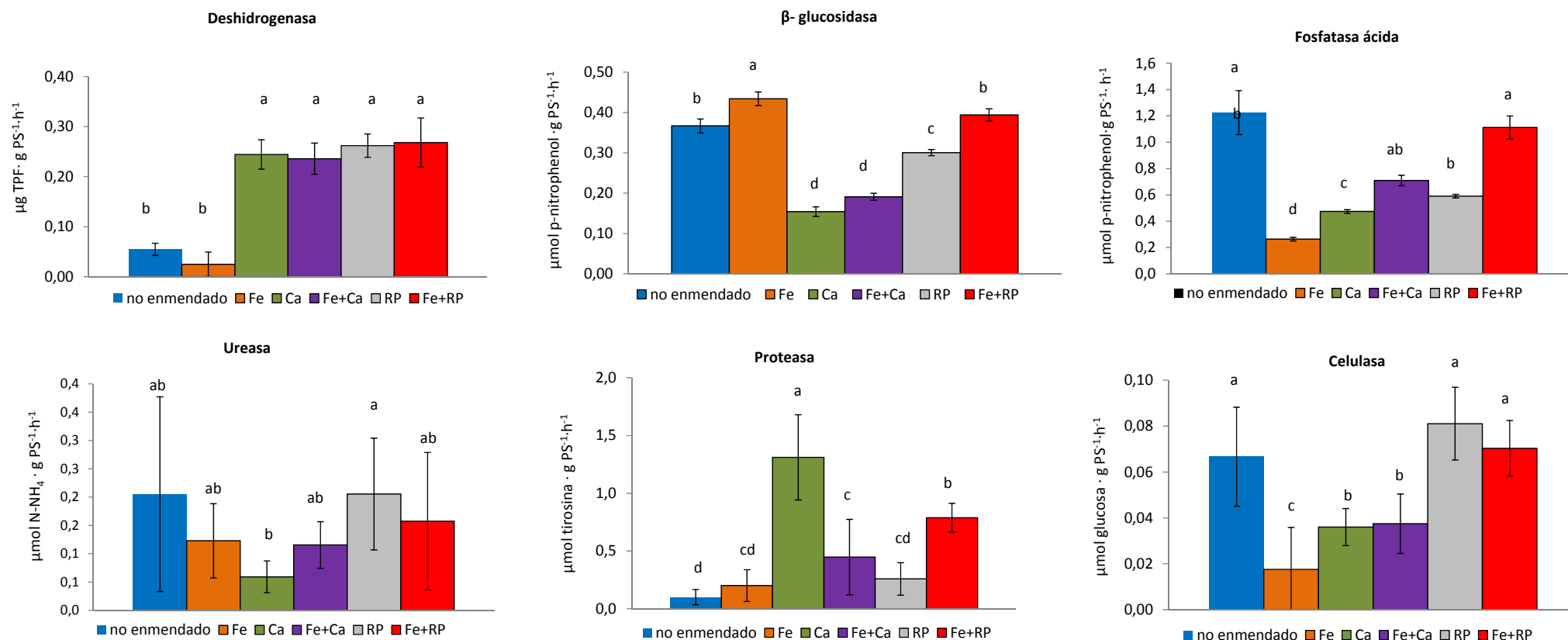


Figura 49. Actividades enzimáticas deshidrogenasa, β-glucosidasa, fosfatasa ácida, ureasa, proteasa y celulasa, media±ET, n=8. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos (P<0,05). no enmendado (NE), FeSO₄ ('Fe'); CaCO₃ ('Ca'); FeSO₄+CaCO₃ ('Fe+Ca'); residuo de papelera ('RP'); y FeSO₄+residuo de papelera ('Fe+RP').

Tabla 64. Factores de carga de las variables peso fresco de *A. elatius*, peso fresco de *F. curvifolia*, pH del suelo, concentración de As, Cu, Mn y Zn extraídos con sulfato amónico 0,1M, P y K disponibles y las actividades deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa ácida, ureasa, proteasa y celulasa sobre dos componentes principales, CP1: primera componente, CP2: segunda componente. Las correlaciones fueron significativas cuando los valores superaron el valor 0,400.

	CP1	CP2
<i>A. elatius</i>	0,974	0,021
<i>F. curvifolia</i>	0,950	0,066
pH suelo	0,968	-0,131
K disponible	0,963	0,148
P disponible	0,917	-0,007
Mn extraíble	-0,810	-0,178
Cu extraíble	-0,935	-0,237
Zn extraíble	-0,931	-0,073
As extraíble	0,658	-0,058
Deshidrogenasa	0,709	-0,002
β -glucosidasa	-0,810	0,404
Ácido fosfatasa	0,139	0,742
Ureasa	-0,112	0,636
Proteasa	0,517	-0,546
Celulasa	0,422	0,808
Eigen Value	9,031	2,201
Varianza explicada (%)	60	15

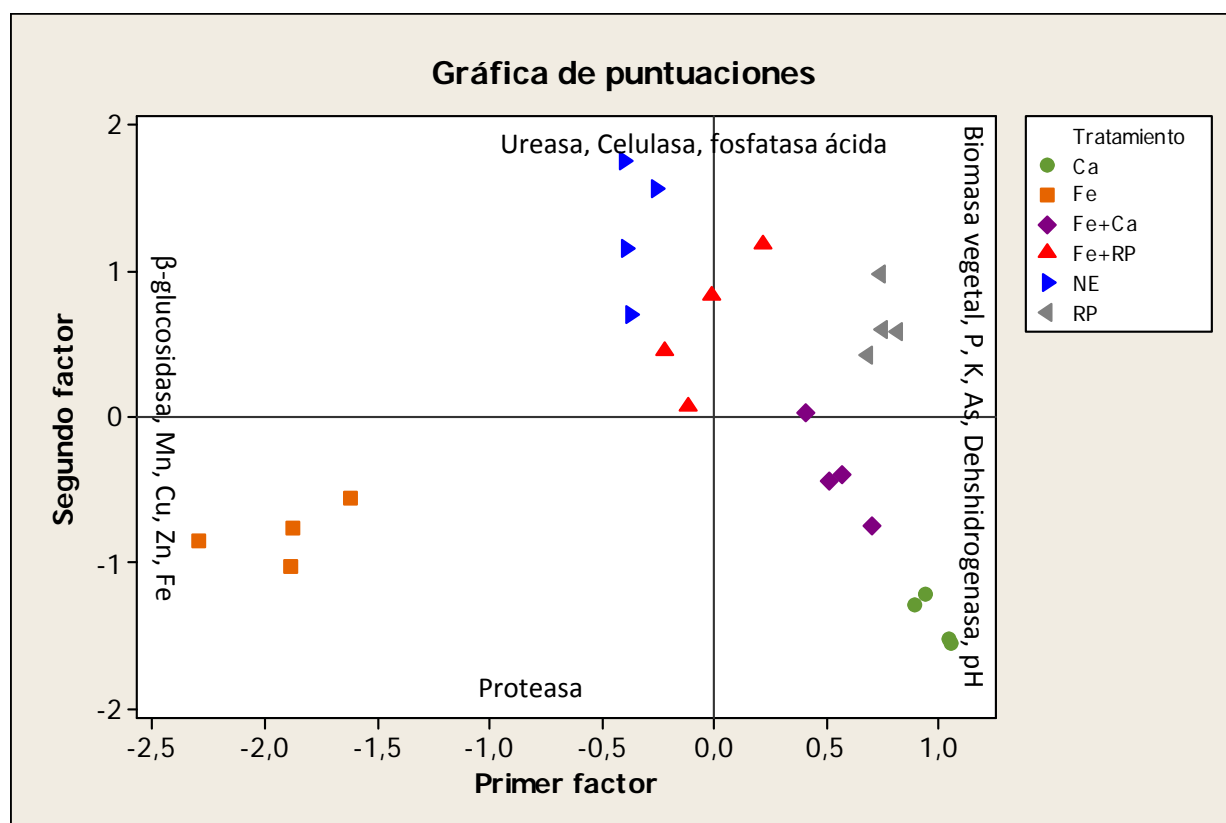


Figura 50. Gráfica de puntuaciones sobre las componentes CP1, primera componente principal; CP2, segunda componente principal. Cada tratamiento fue replicado cuatro veces, lo que genera cuatro puntos por tratamientos. no enmendado (NE), FeSO_4 ('Fe'); CaCO_3 ('Ca'); $\text{FeSO}_4+\text{CaCO}_3$ ('Fe+Ca'); residuo de papelería ('RP'); y FeSO_4 +residuo de papelería ('Fe+RP').

Tabla 65. Concentración de As, Cu, Mn y Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) extraídos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M; P disponible ($\text{mg P}_2\text{O}_5\cdot\text{Kg}^{-1}$) y K disponible ($\text{mg K}_2\text{O}\cdot\text{Kg}^{-1}$); pH del suelo ($P<0,05$; media \pm ET, $n=4$). n.d: por debajo del límite de detección. No enmendado (NE), FeSO_4 ('Fe'); CaCO_3 ('Ca'); $\text{FeSO}_4+\text{CaCO}_3$ ('Fe+Ca'); residuo de papelería ('RP'); y FeSO_4 +residuo de papelería ('Fe+RP').

Trat.	As	Cu	Mn	Zn	P	K	pH
'NE'	2,7 \pm 0,1 a	2,5 \pm 0,06 b	6,2 \pm 0,4 b	8,6 \pm 0,7 a	95,0 \pm 1,7 c	59,0 \pm 1,9 b	5,0 \pm 0,03 c
'Fe'	0,4 \pm 0,03 c	8,4 \pm 0,9 a	65,7 \pm 22,5 a	16,6 \pm 3,0 a	n.d	20,0 \pm 0,8 c	3,4 \pm 0,02 d
'Ca'	3,6 \pm 0,3 a	0,2 \pm 0,08 c	n.d	n.d	198,6 \pm 5,6 a	77,6 \pm 3,5 a	8,2 \pm 0,07 a
'Fe+Ca'	1,7 \pm 0,4 b	0,3 \pm 0,1 c	0,9 \pm 0,3 d	0,2 \pm 0,1 c	125,4 \pm 4,7 b	74,8 \pm 2,7 a	7,4 \pm 0,04 a
'RP'	2,9 \pm 0,06 a	0,1 \pm 0,06 c	n.d	0,13 \pm 0,10 c	207,9 \pm 4,8 a	76,9 \pm 2,7 a	7,4 \pm 0,08 a
'Fe+RP'	0,2 \pm 0,02 d	0,4 \pm 0,5 c	28,8 \pm 3,9 c	2,1 \pm 1,0 b	75,4 \pm 3,5 d	61,3 \pm 3,2 b	6,6 \pm 0,10 b

3.2 Efecto de las enmiendas sobre la mortalidad y evitación de *Eisenia fetida*

El tratamiento 'Fe' fue el más tóxico para los organismos de *E. fetida* y fue el único en el que se pudo observar un efecto tóxico agudo. El suelo no diluido con suelo artificial (100% suelo contaminado) registró los datos más elevados de mortalidad. Sin embargo no se pudieron calcular los valores de EC_{50} porque los organismos no murieron en el resto de diluciones, lo cual pone bajo cuestión el test de mortalidad con *E. fetida* para detectar niveles bajos de toxicidad en estos suelos dado que es bien sabido la capacidad de adaptación de estos organismos a condiciones adversas (Alvarenga et al. 2008c, 2012). Teniendo en cuenta los resultados, los ensayos de evitación en el tratamiento fueron realizados con todas sus diluciones excepto con la que contenía el 100% del suelo contaminado. En el resto de tratamientos, tras 14 días de exposición, los organismos no murieron, por lo que los ensayos de evitación se realizaron con todos los suelos y sus respectivas diluciones (12,5, 25, 50 y 100% p/p, Tabla 66).

A diferencia de los ensayos agudos de mortalidad, los de evitación fueron más sensibles a la exposición a la matriz tóxica, de manera que alguno de los tratamientos afectó negativamente a la función hábitat del suelo, encontrando porcentajes de evitación iguales o superiores al 60%. El tratamiento 'Fe+RP' causó un impacto no beneficioso sobre las lombrices, encontrándose evitación y una función hábitat del suelo limitada en todas las diluciones del suelo. Se encontraron también indicios de una función hábitat limitada en el tratamiento 'Ca' en las diluciones 12,5, 25 y 50%; y con el 100% de 'NE' y 'Fe+Ca'. El tratamiento 'RP' fue el que mejoró la función hábitat en comparación con el resto. No se observó mortalidad de las lombrices durante la duración de los ensayos.

Aunque otros tratamientos registraran una mayor concentración extraíble de metales y arsénico que 'Ca' y 'Fe+Ca' (Tabla 65), el comportamiento de evitación observado en estos tratamientos pudo estar influenciado por una mayor sensibilidad de los organismos hacia el arsénico. Sin embargo, el arsénico no pudo ser la causa directa de ello puesto que también se encontró una alta concentración en el tratamiento 'RP'. Además, los tratamientos que indujeron la mayor respuesta tóxica en los ensayos de evitación de *E. fetida*, 'Ca' y 'Fe+RP', registraron unas características físico-químicas bastante diferentes: pH del suelo y concentración extraíble de As y metales, dificultando la obtención de una conclusión directa. Otros factores deberían tenerse en cuenta para explicar la respuesta. Natal-da-Luz et al. (2004,2008) expusieron que la presencia de otros contaminantes y la calidad de cada una de las fracciones que componen el suelo junto con la duración de la exposición deberían tenerse en cuenta. Una duración del ensayo superior a dos días podría ser aconsejable para asegurar la consolidación de la respuesta

de las lombrices. También, la preparación de las muestras puede influir sobre la sensibilidad de los ensayos (Knoke et al., 1999).

Los ensayos de evitación son metodologías útiles para determinar riesgos sobre el ecosistema, aunque es necesario el perfeccionamiento del protocolo para reducir la variabilidad de la respuesta y para conocer e interpretar otros factores que puedan distorsionar la respuesta de los organismos. Un ejemplo son las propiedades físicas de los suelos, tanto del suelo test como del artificial. En el protocolo no se establece que ambos suelos compartan necesariamente las mismas propiedades físicas, pero sin embargo las diferencias entre ambos pueden afectar a los resultados (Alvarenga et al., 2012). Se ha sugerido el uso de suelo natural en lugar de artificial, sin contaminación y con las mismas propiedades físicas que el suelo contaminado (Jänsch et al., 2005). Como recomendación para futuros ensayos, se puede usar suelo natural no contaminado como control en lugar del sustrato artificial.

Tabla 66. Porcentajes de evitación de *E. fetida* del suelo contaminado (suelo test). * evitación significativa a $P < 0,05$; n.ev: no se observó evitación. No enmendado ('NE'), FeSO_4 ('Fe'); CaCO_3 ('Ca'); $\text{FeSO}_4 + \text{CaCO}_3$ ('Fe+Ca'); residuo de papelera ('RP'); y FeSO_4 +residuo de papelera ('Fe+RP').

Tratamiento	% del suelo test			
	12,5	25	50	100
'NE'	n.ev	n.ev	n.ev	70*
'Fe'	n.ev	n.ev	20*	n.ev
'Ca'	35*	65*	23*	n.ev
'Fe+Ca'	n.ev	n.ev	n.ev	69*
'RP'	n.ev	n.ev	n.ev	n.ev
'Fe+RP'	60*	75*	60*	85*

3.3 Efecto de las enmiendas sobre la inmovilización de *D. magna* y la inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri*

Los valores de EC_{20} y EC_{50} obtenidos en los ensayos con *D. magna* y *V. fischeri* representan el lixiviado del suelo contaminado diluido en % (v/v) que causa una reducción de la respuesta del 20 y el 50% respectivamente (Tabla 67). Estos ensayos se realizan poniendo en contacto a los organismos con los lixiviados extraídos de los suelos contaminados. En la Tabla 68 se muestra la concentración de metal(oid)es en los lixiviados.

Solo se pudieron calcular los valores de EC_{50} en los ensayos llevados a cabo con *D. magna* en el tratamiento 'Fe', porque en los demás no se observó inmovilización de los organismos. Los bioensayos con *V. fischeri* fueron más sensibles a los tratamientos que lo que fue *D. magna* aunque los valores de EC_{50} no pudieron ser calculados en el ensayo de bioluminiscencia pero si los de EC_{20} .

El tratamiento 'Fe' fue tóxico para *D. magna*, registrándose un valor bajo de EC_{50} (9,8% v/v). En comparación con Alvarenga et al. (2007), las concentraciones de algunos metales en los lixiviados del suelo, en concreto Zn y Cu en el tratamiento 'Fe' fueron similares y superiores respectivamente, lo cual puede explicar los efectos tóxicos observados.

Los suelos sin enmienda y los tratamientos 'Fe' y 'Fe+RP' fueron tóxicos para *V. fischeri*, siendo 'Fe' el que presentó una mayor toxicidad (menor EC_{20}). Además, los bioensayos de luminiscencia mostraron una cierta recuperación en el tratamiento 'Fe+RP' observado por el aumento de su EC_{20} en la segunda fracción de 15 minutos, lo que indica una recuperación del conjunto de bacterias y un posible efecto reversible de la toxicidad después de un tiempo prolongado de exposición. Esta recuperación no fue observada ni en 'Fe' ni en los suelos sin enmienda, por lo que se puede concluir que la incorporación de sulfato ferroso, sin la combinación con ningún otro material, fue el tratamiento más perjudicial para ambos organismos. Todas las otras enmiendas tuvieron un efecto beneficioso sobre la bioluminiscencia de *V. fischeri* en comparación con los suelos no enmendados. Los efectos perjudiciales observados en la respuesta de estos organismos pueden ser atribuidos a la concentración de metal(loid)es presentes en los lixiviados utilizados para los ensayos (Alvarenga et al., 2007). Por tanto la toxicidad puede ser explicada en parte por las altas concentraciones de Cu, Mn y Zn en ambos tratamientos con sulfato ferroso ('Fe' y 'Fe+RP') en comparación con los demás incluido 'NE' (Tabla 68). Los valores de EC_{20} en el tratamiento 'Fe' para *V. fischeri* fueron los más bajos para concentraciones de Cu y Zn en los lixiviados de 0,07 y 0,2 $mg \cdot L^{-1}$ respectivamente. Otros autores encontraron concentraciones similares de Zn e inferiores de Cu que las registradas en el tratamiento 'Fe' (0,13-0,2 $mg \cdot L^{-1}$ para Zn y 0,0021-0,0015 $mg \cdot L^{-1}$ para Cu en Alvarenga et al., 2007). En los otros tratamientos tóxicos, la concentración requerida para causar una disminución del 20% de la bioluminiscencia fue más baja en comparación con 'Fe' (0,002 y 0,01 $mg \cdot L^{-1}$ para Cu y Zn en 'NE'; 0,007 y 0,03 $mg \cdot L^{-1}$ para Cu y Zn en 'Fe+RP'). Las altas concentraciones de As en los suelos sin enmienda podrían explicar parcialmente la toxicidad encontrada en este tratamiento.

Otros autores han mostrado concentraciones más elevadas de metales que las de los lixiviados en el presente trabajo (Renoux et al., 2001; Trisdis et al., 2006). Sin embargo, en estos

trabajos mencionados fue posible calcular la EC_{50} , lo cual significa que los lixiviados obtenidos a partir de sus suelos fueron más tóxicos que los de este trabajo, que únicamente permitieron el cálculo de EC_{20} . Además, cabe asumir que en aquellos tratamientos donde se pudieron calcular valores de EC_{20} los bajos valores de pH en pueden haber sido la causa principal de la reducción de la bioluminiscencia de *V. fischeri* o de la inmovilización de *D. magna*. Para ello, en aquellos tratamientos en los que los lixiviados fueron ácidos, ambos bioensayos fueron realizados con una corrección del pH de los lixiviados ($7,0 \pm 0,1$) como especifica el método ISO 11348-2, (1998), obteniéndose un efecto tóxico similar. Este resultado indica que la toxicidad se atribuye a la composición de la matriz y/o a la matriz y al pH, pero no únicamente a la acidez de los lixiviados. Los resultados que se muestran en las tablas corresponden a los lixiviados con el pH original sin corrección de acidez.

Tabla 67. Ensayos de toxicidad aguda con *D. magna* y *V. fischeri*. (EC_{20} , $n=6$). n.t: no se observó efecto tóxico.

Inmovilización (<i>D. magna</i>)		Inhibición de la luminiscencia (<i>V. fischeri</i>)			
EC_{50} (%v/v)		EC_{20} (%v/v)		EC_{50} (%v/v)	
Tratamiento	48 h	15 min	30 min	15 min	30 min
NE	n.t	21,24	17,79	n.t	n.t
Fe	9,8	13,37	13,90	n.t	n.t
Ca	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
Fe+Ca	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
RP	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
Fe+RP	n.t	11,88	23,41	n.t	n.t

Tabla 68. Concentraciones de As y metales ($mg \cdot L^{-1}$) en los lixiviados de los suelos (ratio 1:10 suelo:agua).

	As	Cu	Mn	Zn	Fe
NE	0,223	0,013	0,034	0,072	0,025
Fe	0,024	0,529	5,64	1,623	0,172
Ca	0,841	0,014	0,004	0,052	0,030
Fe+Ca	0,088	0,001	0,057	0,05	0,019
RP	0,922	0,020	0,011	0,046	0,065
Fe+RP	0,054	0,029	2,644	0,147	0,055

Como subrayan otros autores, un único bioensayo es insuficiente para monitorizar un proceso de remediación puesto que las respuestas de los organismos a la toxicidad son complejas. Es esencial poner en marcha una batería de bioensayos y seleccionar entre aquellos los que ofrezcan mayor confianza para evaluar la reducción de los efectos adversos causados por los contaminantes en el proceso remediador (Marwood et al., 1998). Alvarenga et al. (2008a) y Chaîneau et al. (2003) observaron que los ensayos con *V. fischeri* y el crecimiento vegetal fueron los indicadores más sensibles y de mayor confianza para evaluar la reducción de los efectos adversos causado por los contaminantes, más que la supervivencia de lombrices o la germinación de semillas. Este hecho es significativo, puesto 'Fe+RP' favoreció el crecimiento vegetal en comparación con los otros tratamientos (Capítulo IV.2) los bioensayos con *V. fischeri* y con *E. fetida* mostraron que este tratamiento no proporcionó condiciones favorables para estos organismos. Además, tratamientos que redujeron sustancialmente la concentración de metales en la solución del suelo provocaron efectos tóxicos sobre las lombrices ('Ca').

4. CONCLUSIONES

- La toxicidad observada para los tres organismos estudiados estuvo parcialmente asociada a la concentración de arsénico y metales en el suelo y en los lixiviados, así como al pH del suelo. Se recomienda utilizar un conjunto de bioensayos para evaluar el éxito del proceso remediador. Los ensayos de evitación con *E. fetida* y los bioensayos de luminiscencia con *V. fischeri* fueron los más sensibles a la toxicidad del suelo, por lo que ambos ensayos pueden ser usados como indicadores en futuros procesos de remediación en nuestra área de estudio. La actividad enzimática deshidrogenasa deberá ser determinada junto estos dos últimos bioensayos mencionados, puesto que todos ellos proporcionan información relevante sobre el efecto de las enmiendas en el suelo, en este caso sobre la mejora de la calidad del suelo.
- Según los resultados obtenidos en este capítulo, la función hábitat de los suelos está dañada. El requerimiento de una intervención en nuestra área de estudio y la incorporación de enmiendas para mejorar la salud del suelo es esencial. Los tratamientos encalantes 'RP' y 'Fe+Ca' fueron los que mostraron los mejores resultados para los bioensayos seleccionados desde el punto de vista ecotoxicológico
- El aporte de sulfato ferroso (1% p/p) sería el peor escenario posible. Aunque redujo considerablemente la concentración de As extraíble, aumentó la de Cu, Mn y Zn como consecuencia de la disminución de pH del suelo. Las actividades enzimáticas fueron afectadas negativamente, no permitió la emergencia ni el crecimiento vegetal, provocó la muerte de *E. fetida* en la concentración más alta (100% p/p) y los lixiviados obtenidos mediante agitación fueron tóxicos para *D. magna* y *V. fischeri*. La combinación de sulfato ferroso (1% p/p) con otros materiales (CaCO_3 1% p/p y residuo de papelera 1% p/p) contribuyó a un descenso del As extraíble y a un aumento del pH cercano a la neutralidad. Como consecuencia, la actividad deshidrogenasa, el crecimiento vegetal y algunos de los bioensayos identificaron esos tratamientos como las mejores opciones para este tipo de suelo con multi-contaminación.

4. CONCLUSIONS

- Toxicity towards the three organisms tested in the bioassays was partly related to metal(loid) concentration both in the soil extracts and leachates, as well as in soil pH. The use of a battery of bioassays is recommended to evaluate remediation success. *E. fetida* avoidance behaviour and *V. fischeri* luminescence tests were the most sensitive indicators of soil toxicity, supporting the recommendation that these two organisms are used in future monitoring of the effects of amendment application on phytoremediation processes on the site the soil is from. It is suggested that dehydrogenase activity is measured in conjunction with these bioassays given its association with plant biomass production
- Habitat function in the unamended soil is impaired. This suggests that incorporation of amendments in order to improve soil quality is essential on the site the soil was taken from. The liming treatments 'RP' and 'Fe+Ca' were the most appropriate amendments from the ecotoxicological point of view
- The treatment with FeSO₄ 1% w/w was the "worst case scenario" tested; although it was able to reduce extractable As, it increased extractable Cu, Mn and Zn concentrations as a consequence of the decrease in soil pH. This treatment had a detrimental effect on some soil enzymatic activities (e.g. dehydrogenase, acid phosphatase, urease and cellulase); did not allow plant growth; induced *E. fetida* mortality in the highest concentration tested (100% w/w) and its soil leachate was very toxic towards both *D. magna* and *V. fischeri*. The combined application of FeSO₄ 1% w/w with other amendments (e.g. CaCO₃ 1% w/w and paper mill 1% w/w) led to a decrease in extractable As and metals, and a soil pH value closer to neutrality. Consequently, dehydrogenase activity, plant growth and the bioassays identified these combined treatments as preferable in this particular multi-contaminated soil

CONSIDERACIONES FINALES

CONSIDERACIONES FINALES

I. ESTUDIO DE ESPECIES VEGETALES PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR ARSÉNICO Y METALES PESADOS

Antes de la introducción de especies vegetales en campo, es necesario evaluar su capacidad de supervivencia y su potencial para hacer frente a la contaminación en condiciones controladas.

Salix atrocinerea, *C. scoparius* e *H. cannabinus* crecieron en hidroponía con dosis elevadas de arsénico, aunque *H. cannabinus* mostró mayor sensibilidad a dicho elemento (menor crecimiento, síntomas visuales de toxicidad). Por este motivo se descartó su uso en posteriores ensayos. Estas especies tienen un comportamiento excluyente frente al As, por lo que especialmente *S. atrocinerea* y *C. scoparius* son adecuadas para su uso en fitoestabilización de suelos contaminados con As. *Salix atrocinerea* mostró cierta capacidad de transporte de Cd a la parte aérea (ratio parte aérea:raíz = 0,8), por lo que podría incluirse en programas de fitoextracción de Cd, como ha sido observado por otros autores (Vervaeke et al., 2003; Dickinson y Pulford, 2005).

Cynara cardunculus demostró también su resistencia en términos de crecimiento, con un desarrollo radicular comparable al de las dos especies leñosas ensayadas. Hasta el segundo año de cultivo las plantas de cardo no desarrollan sus hojas características en forma de roseta, de formas que a partir de ese momento la biomasa de la parte aérea se incrementa significativamente (Gominho et al., 2011). Los ensayos no llegaron hasta este segundo estadio de crecimiento, por lo que sería interesante realizar un cultivo bianual para evaluar su respuesta a los contaminantes en ambos momentos de crecimiento. Por este motivo, en ensayos posteriores a más corto plazo no se utilizó esta especie.

En los ensayos a corto plazo se han utilizado especies herbáceas también autóctonas de la zona de la mina de arsenopirita de Bustarviejo, *A. elatius* subs. *Bulbosum* y *F. curvifolia*. Las especies *A. elatius* y *F. curvifolia* mostraron una gran capacidad de tolerancia a As y metales, incluso registrando valores de biomasa superiores en aquellos tratamientos donde la concentración soluble de As fue más elevada. *Arrhenaterum elatius* desarrolló una mayor cantidad de biomasa y mayor extensión superficial. Los tratamientos 'Fe+Ca', 'Ca', 'RP' y 'Fe+Cmp' fueron los que más ayudaron al crecimiento vegetal, superando significativamente la biomasa del tratamiento control. La absorción de elementos traza no siguió un patrón claro y no estuvo condicionada por la mayor o menor movilización de los metal(oid)es. Ambas presentan

también un carácter excluyente para los contaminantes. Por tanto, también serían aptas para su uso en programas de fitoestabilización y/o revegetación de suelos de mina. Dado su carácter colonizador podrían ser el punto de partida en un programa de revegetación para establecer una sucesión ecológica, aunque la restauración mediante la introducción de especies arbustivas también es frecuente (Gómez-Aparicio et al., 2004). Esta sucesión ecológica, llamada secundaria, sería la correspondiente a la instaurada después de la introducción de un proceso disruptivo del medio, como el creado por las actividades mineras llevadas a cabo en la zona y por la presencia de las escombreras. La proximidad espacial con otras especies de diferente porte, como arbustos y árboles, será beneficiosa para las especies introducidas, sobre todo en condiciones mediterráneas en las que la sequía propia del verano produce estrés biótico. *Salix atrocinerea* es una especie que requiere una mayor humedad edáfica para su supervivencia que otras especies leñosas de la mina, por lo que debería implantarse en la ribera de las dos corrientes de agua que atraviesan las escombreras y/o en zonas con una mayor humedad del suelo en el área de la mina; y *C. scoparius* es capaz de sobrevivir en medios más áridos, como los que se encuentran en las inmediaciones de la mina. Por tanto, el uso de ambas especies permitiría ampliar la expansión del área de implantación y no limitarse a una sola zona en concreto.

El arsénico en el suelo se encuentra principalmente retenido en fracciones asociadas a óxidos de Fe y Al, incluso cuando se añade una fuente de arsénico soluble. Estas fracciones son escasamente reactivas por lo que aportan poco As a la fracción soluble, mientras que las fracciones más lábiles, F1 y F2, son las minoritarias. Para evaluar esta fracción de As se han utilizado sondas de extracción de la disolución del suelo, extracción con sulfato amónico 0,1 M (elemento extraíble) y columnas de lixiviación, que permiten evaluar la fracción soluble de forma continua a más largo plazo.

Las sondas de extracción nos han permitido hacer un seguimiento de los cambios producidos en la solubilidad de arsénico y metales, causados tanto por la presencia o no de plantas como por la aplicación de enmiendas. Las especies *C. scoparius* y *C. cardunculus* redujeron la concentración de As soluble en comparación con los tiestos donde crecía *S. atrocinerea* y los tiestos sin planta para la dosis más alta de As. En cambio, en la extracción secuencial de As del suelo no se encontraron diferencias en la concentración de As en las fracciones F1 y F2 entre los distintos cultivos, incluidos los sin planta. En los suelos con multicontaminación, se observó una reducción de la concentración extraíble de As en los tiestos con *C. scoparius*, aunque no de metales. El escaso impacto de las plantas sobre las fracciones más fácilmente disponibles de As junto con la necesidad de mejorar las propiedades físico-

químicas del suelo para establecer una cubierta vegetal determina que dentro del programa de remediación de la mina de arsenopirita sea necesario un apoyo para contribuir a la inmovilización de todos los contaminantes presentes en la zona. La aplicación de enmiendas al suelo se presenta como una alternativa viable para garantizar la estabilización de la contaminación y facilitar la implantación vegetal.

Por ello, la continuación de la investigación se centró en la evaluación de enmiendas para la reducción de las fracciones más lábiles de elementos contaminantes y los cambios producidos en la salud y calidad del suelo a nivel ecotoxicológico ante las modificaciones que supuso la aplicación de enmiendas al suelo.

II. APLICACIÓN DE ENMIENDAS AL SUELO. EVALUACIÓN DE LA REMEDIACIÓN MEDIANTE PARÁMETROS ECOTOXICOLÓGICOS

El objetivo de nuestra estrategia de remediación (fitoestabilización asistida) consiste en la reducción de la fracción disponible de elementos contaminantes a niveles aceptables en un periodo razonable de tiempo. La incorporación de enmiendas al suelo junto con la especies estudiadas pretende cumplir este objetivo a través de procesos de adsorción de elementos traza sobre fases minerales, (co)precipitación en las superficies de óxidos e hidróxidos, complejación con ligandos orgánicos e intercambio iónico (Kumpiene et al., 2008). En esta parte se expondrá el efecto de la modificación de ciertas propiedades físico-químicas del suelo sobre la movilización de elementos traza mediante ensayos en columnas de lixiviación y en ensayos en mesocosmos y macrocosmos.

Los tratamientos con poder encalante se correspondieron con 'Fe+Ca', 'Ca' y 'RP', encontrando que la estabilidad de los valores de pH a lo largo del ensayo se mantuvieron durante el curso de los ensayos, tanto en los lixiviados de los ensayos con columnas como en la disolución del suelo de los ensayos en mesocosmos y macrocosmos. Teniendo en cuenta que las columnas de lixiviación proporcionan información a más largo plazo, el pH de la disolución del suelo en los tres tratamientos encalantes no se modificaría en ensayos de mayor duración con planta.

El tratamiento con sulfato ferroso, 'Fe', produjo una disminución del pH en el ensayo en mesocosmos, aunque el pH de los lixiviados de las columnas presentó valores superiores que en la disolución del suelo. La mayor oxidación del sulfato ferroso en los tiestos puede haber sido la

causa por la que se haya liberado una mayor concentración de protones y de esta manera haya bajado el pH rápidamente a valores próximos a 3.

El tratamiento 'Fe+RP' registró valores de pH ácido, tanto en la disolución del suelo (ensayo en mesocosmos) como en los lixiviados (columnas). En el ensayo en macrocosmos, dado al pH inicial de los suelos, no se registró la acidez inicial que se observó en estos otros dos ensayos. En las columnas de lixiviación se pudo observar mejor el efecto de los óxidos de hierro sobre el pH con el tiempo. Se comenzó con valores similares a los del control, pero a medida que se lixiviaba Fe y que la conductividad eléctrica se reducía, el pH aumentaba gracias al efecto encalante del residuo de papelera. En los ensayos en mesocosmos no se llegó a observar el efecto del residuo de papelera sobre el incremento del pH en la disolución del suelo, pues se corresponde con los primeros muestreos del ensayo en las columnas. Por tanto, es previsible un incremento del pH con plazos superiores de tiempo, con los efectos que conlleva sobre los contaminantes.

Los tratamientos 'Fe+Ca' y 'Fe+RP' redujeron la movilización de As a corto plazo en las columnas, coincidiendo con los resultados obtenidos en la disolución del suelo en mesocosmos y macrocosmos. Por tanto, la liberación de As en los ensayos mesocosmos y macrosomos se corresponde con las fracciones iniciales de la lixiviación de As de las columnas. La duración del ensayo no fue tan prolongada como para observar efectos a largo plazo derivados del agotamiento de las enmiendas de Fe y de la subida del pH, pero es probable que en momentos más avanzados de los ensayos seamos capaces de advertir estos cambios. Los valores de pH alrededor de 3 en el tratamiento 'Fe' del ensayo en mesocosmos pudieron haber impedido la formación de óxidos de hierro. Esto, junto con el carácter neutro del arsénico a esos niveles de pH explicaría que el As no se retuvo (en comparación con el control) en los ensayos en mesocosmos pero si en el suelo de las columnas, donde un pH más elevado permitió la formación de nuevas fases minerales de Fe. El residuo de papelera y el carbonato de calcio añadidos sin sulfato ferroso provocaron la movilización de As. Como muestran los ensayos de lixiviación el efecto sobre el pH de las enmiendas es duradero en el tiempo, de manera que se descarta su uso individual a pesar de que estimularon el crecimiento vegetal. Otra de las combinaciones prometedoras fue 'Fe+Cmp'. En el ensayo en macrocosmos fue la que contribuyó a la mayor disminución del As en la disolución del suelo, por lo que sería de interés probarla en las columnas de lixiviación para evaluar su efectividad a más largo plazo.

Los tratamientos encalantes 'Ca' y 'RP' redujeron en todos los ensayos la movilización de Zn, Cu (excepto en los primeros muestreos) y Mn. La concentración de este último en los tratamientos 'Fe+Ca' y 'Fe+RP' no disminuyó. Estos resultados se corresponden con los

obtenidos en la disolución del suelo. La movilización de Fe aumentó en el ensayo en mesocosmos con los tratamientos 'Fe' y 'Fe+RP', pero no en 'Fe+Ca', tal y como se observó en las columnas dado el pH básico de los lixiviados.

La lixiviación de elementos traza de las columnas complementó los resultados obtenidos en los ensayos en mesocosmos y macrocosmos. En los tratamientos comunes con los del ensayo de las columnas de lixiviación, se observó un comportamiento similar de los elementos traza y del pH a corto plazo. Esta correspondencia demuestra la validez de ambos métodos de extracción de las fracciones solubles de elementos traza. Dada esta relación entre los resultados, la monitorización de la contaminación en ensayos en campo puede realizarse con las sondas de extracción de la disolución del suelo. Las sondas permitirán determinar los cambios en la efectividad de las enmiendas y el momento del ensayo en el que se deba realizar un nuevo aporte para asegurar a largo plazo la continuidad de la retención de elementos traza, ya sea renovando las dosis originales, complementándolas y controlando la estabilidad del pH para garantizar la mínima solubilidad de As. Puesto que se ha observado que los principales cambios en el pH y en la concentración de As en algunos de los tratamientos tienen lugar en las primeras fracciones de la lixiviación, en campo será necesaria una monitorización continuada más profusa a corto plazo desde la implantación de los tratamientos. Se requieren estudios adicionales sobre las dosis necesarias en las siguientes aplicaciones de enmiendas o incluso una valoración de las dosis iniciales para garantizar la formación de óxidos de Fe y el mantenimiento del pH óptimo para la supervivencia vegetal evitando la liberación excesiva de As.

Las columnas de lixiviación permiten evaluar el comportamiento de los elementos traza y extrapolarlos a condiciones reales a corto y largo plazo. La estimación se ha realizado en función del volumen real de agua que circulaba a través de las columnas. Si tenemos en cuenta el régimen anual de precipitaciones, el volumen de agua que pasa a través del suelo es función del tiempo. No se puede establecer con precisión el momento en el que se registrarían las variaciones más considerables en la tendencia de la lixiviación de arsénico y metales, puesto que en condiciones reales la movilización está sujeta a factores que en este ensayo no se tienen en cuenta, como son el desarrollo de la cubierta vegetal y la aparición de vegetación espontánea, la actividad de los microorganismos, el secado del suelo tras las precipitaciones, la erosión por vía aérea, movimientos de tierra, etc., pero son de gran utilidad para:

- Reducir el tiempo requerido en ensayos con suelos en contenedores expuestos a la atmósfera para observar efectos a largo plazo y así facilitar la elección de enmiendas, dosis y combinaciones.
- Permitir diferenciar el ritmo de liberación de los elementos traza entre enmiendas que previsiblemente pueden actuar de manera análoga, como por ejemplo los materiales encalantes, y otros cuyo origen sea similar pero heterogéneos en su composición y propiedades, como pueden ser diferentes composts.

Mediante la realización de los bioensayos se ha conseguido seleccionar un conjunto de ellos para la evaluación de la mejora de la calidad del suelo de la mina. Los ensayos de evitación con *E. fetida* y los de bioluminiscencia con *V. fischeri* fueron seleccionados por su mayor sensibilidad a la matriz tóxica. También se ha seleccionado la actividad deshidrogenasa por su correlación con la biomasa vegetal, el pH del suelo y la concentración de nutrientes. Estos ensayos se proponen como herramientas necesarias en la evaluación de la remediación en condiciones de campo y en futuros ensayos con suelos de similares características físico-químicos. La selección de las enmiendas más eficaces se ha realizado no solo teniendo en cuenta su capacidad para inmovilizar contaminantes en el suelo, sino también teniendo en cuenta sus efectos tóxicos sobre los organismos evaluados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Las especies vegetales autóctonas de la mina Mónica de arsenopirita, *Salix atrocinerea*, *Cytisus scoparius*, *Arrhenaterum elatius* subs. *Bulbosus* y *Festuca curvifolia* son las más adecuadas para la revegetación de suelos mineros contaminados con arsénico y metales pesados
- Las especies autóctonas seleccionadas son exclusoras de As, por lo que su uso se debe centrar en programas de remediación mediante fitoestabilización. Solamente las plantas de *C. scoparius* consiguieron reducir las fracciones más solubles de As, por lo que es necesario el apoyo de otras técnicas para reducir significativamente la movilización de elementos traza
- La movilidad de As en el suelo es limitada. Las fracciones mayoritarias son las asociadas a óxidos amorfos y cristalinos de Fe y Al
- El tratamiento 'Fe' fue el más eficiente en la retención de As en el suelo, pero incrementó la solubilidad de metales. Los tratamientos 'Fe+RP' seguido de 'Fe+Ca' fueron efectivos en la retención de As a corto plazo y de metales a largo plazo
- Los ensayos ecotoxicológicos con *Vibrio fischeri* y *Eisenia fétida* (evitación), la producción de biomasa de *Arrhenaterum elatius* y *Festuca curvifolia* y la actividad deshidrogenasa fueron seleccionados como indicadores adecuados para evaluar el progreso de la actividad remediadora en los suelos estudiados. Las enmiendas encalantes 'RP' y 'Fe+Ca' fueron las más adecuadas desde el punto de vista ecotoxicológico
- Atendiendo tanto a parámetros químicos como ecotoxicológicos, el aporte único de sulfato ferroso condujo al peor escenario posible. La combinación de sulfato ferroso con otros materiales (CaCO_3 y residuo de papelera) se propone como la opción más recomendable para la fitoestabilización asistida de suelos contaminados con residuos arsenopiríticos, junto con las plantas de *Arrhenaterum elatius* subs. *Bulbosum*

CONCLUSIONS

- The native plant species from the arsenopyritic Mónica mine, *Salix atrocinerea*, *Cytisus scoparius*, *Arrhenaterum elatius* subs. *Bulbosus* and *Festuca curvifolia* were the most appropriate for the revegetation of mine soils contaminated with arsenic and heavy metals
- The tested plant species behave as arsenic excluders, therefore are suitable for phytostabilisation. Only *C. scoparius* plants reduced soluble As concentrations among plant species tested, indicating amendment application is essential to assist phytoremediation and to reduce trace element mobility significantly
- Arsenic has limited mobility in soils. The most abundant arsenic fractions are associated with amorphous and crystalline Fe and Al oxides
- 'Fe' was the most efficient treatment in reducing As, but increased metal solubility. 'Fe+RP' and 'Fe+Ca' were efficient both in reducing arsenic solubility in the short term and metals mobility in the long term
- Ecotoxicological assays with *Vibrio fischeri* and *Eisenia fetida* (avoidance tests), plant biomass production of *Arrhenaterum elatius* and *Festuca curvifolia* and dehydrogenase activity were selected as good indicators for evaluating soil remediation. According to these indicators, the liming treatments 'RP' and 'Fe+Ca' were the most appropriate amendments
- Both chemical and ecotoxicological assays showed that application of iron sulphate alone had the least desirable effects of all amendments tested. Our findings suggest that the ideal treatment scenario for assisted phytostabilisation of arsenopyritic mine soils planted with *Arrhenaterum elatius* subs. *Bulbosum* is iron sulphate applied in combination with calcium carbonate or paper mill

REFERENCIAS

- Abbas, M. H. H., & Abdelhafez, A. A. (2012). Role of EDTA in arsenic mobilization and its uptake by maize grown on an As-polluted soil. *Chemosphere*, 90, 588–594.
- Abedin J., Beckett P., & Spiers G. (2012). An evaluation of extractants for assessment of metal phytoavailability to guide reclamation practices in acidic soils in northern regions. *Canadian Journal of Soil Science*, 92, 253-268.
- Adriano D.C. (2001). Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag. New York
- Adriano, D. C., Wenzel, W. W., Vangronsveld, J., & Bolan, N. S. (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma*, 122, 121–142.
- Albuquerque, J. A, De la Fuente, C., & Bernal, M. P. (2011). Improvement of soil quality after “alperujo” compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *Journal of Environmental Management*, 92, 733–741.
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995a) Urease activity. En: Alef K., Nannipieri, P. (ed) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press, London, pp 316-320.
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995b). Protease activity. In: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds.), Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London, pp. 313–315.
- Allen, H.E. (2001). Terrestrial ecosystem: an overview, in Bioavailability of Metals, in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Availability to Invertebrates, Microbes, and Plants. SETAC Press, Pensacola, Florida, pp. 1-6.
- Alloway, B.J., 1995. Heavy Metals in Soils, second ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Almås, A. R., Lombnaes, P., Sogn, T. A., & Mulder, J. (2006). Speciation of Cd and Zn in contaminated soils assessed by DGT-DIFS, and WHAM/Model VI in relation to uptake by spinach and ryegrass. *Chemosphere*, 62, 1647–1655.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, P., Fernandes, R. M., Cunha-Queda, C., Duarte, E., & Vallini, G. (2007). Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environment international*, 33, 505–513.

- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, a P., Baião, N., Fernandes, R. M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., & Cunha-Queda, A.C. (2008a). Assessment of chemical, biochemical and ecotoxicological aspects in a mine soil amended with sludge of either urban or industrial origin. *Chemosphere*, 72(11), 1774–1781.
- Alvarenga, P., Gonçalves, a P., Fernandes, R. M., De Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., & Cunha-Queda, a C. (2008b). Evaluation of composts and liming materials in the phytostabilization of a mine soil using perennial ryegrass. *The Science of the Total Environment*, 406, 43–56.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A. P., Fernandes, R. M., De Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., et al. (2008c). Evaluation of tests to assess the quality of mine-contaminated soils. *Environmental Geochemistry and Health*, 30, 95–99.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, a P., Fernandes, R. M., de Varennes, A., Vallini, G., Duarte, E., & Cunha-Queda, A. C. (2009). Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (II) effects on soil biochemical and ecotoxicological characteristics. *Chemosphere*, 74, 1301–1308.
- Alvarenga, P., Palma, P., De Varennes, A., & Cunha-Queda, A. C. (2012). A contribution towards the risk assessment of soils from the São Domingos Mine (Portugal): chemical, microbial and ecotoxicological indicators. *Environmental Pollution*, 161, 50–56.
- Alvarez-Ayuso, E., & García-Sánchez, A. (2003). Sepiolite as a feasible soil additive for the immobilization of cadmium and zinc. *The Science of the total environment*, 305, 1–12.
- An, B., & Zhao, D. (2012). Immobilization of As(III) in soil and groundwater using a new class of polysaccharide stabilized Fe-Mn oxide nanoparticles. *Journal of hazardous materials*, 211-212, 332–41.
- Anawar, H. M., Garcia-Sanchez, A., & Santa Regina, I. (2008). Evaluation of various chemical extraction methods to estimate plant-available arsenic in mine soils. *Chemosphere*, 70, 1459–1467.
- Antosiewicz, D. M., Escudě-Duran, C., Wierzbowska, E., & Skłodowska, A. (2008). Indigenous Plant Species with the Potential for the Phytoremediation of Arsenic and Metals Contaminated Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 193, 197–210.

- Antunes, S. C., De Figueiredo, D. R., Marques, S. M., Castro, B. B., Pereira, R., & Gonçalves, F. (2007). Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment*, 374, 252–259.
- Arnetoli, M., Vooijs, R., Bookum, W., Galardi, F., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Schat, H., & Verkleij, J. A. C. (2008). Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration. *Environmental Pollution*, 152, 585–591.
- Artiola, J.F., Zabcik, D., & Johnson, S.H. (1990). In situ treatment of arsenic contaminated soil from a hazardous industrial site: Laboratory studies. *Waste management*, 10, 73-78.
- Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Mench, M., Pietramellara, G., Nannipieri, P., & Renella, G. (2009). Composition, biomass and activity of microflora, and leaf yields and foliar elemental concentrations of lettuce, after in situ stabilization of an arsenic-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 41, 351–359.
- Asher, C. J., & Reay, P. F. (1979). Arsenic uptake by barley seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 6, 459–466.
- Ashwath, N., Hanggi, S., Midmore, D.J., & Ng, J.C. (2012). Agronomic treatments enhance growth and arsenic uptake by Chinese brake fern (*P. vittata* L.) en Understanding the Geological and Medical Interface of Arsenic, pp. 323-325. Eds Ng, Noller, Naidu, Bundschuh y Brattacharya. Taylor & Francias, London.
- Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations: a review. *Water Air Soil Pollut.* 47, 335–379
- Baird, D.J., Barber, I., Soares, A.M.V.M. & Calow, P. (1991). An early life-stage test with *Daphnia magna* Straus: An alternative to the 21-day chronic test? *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 22, 1-7.
- Baker, A.J.M., & Brooks, R.R., 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements-a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.
- Bang, S., Patel, M., Lippincott, L., & Meng, X. (2005). Removal of arsenic from groundwater by granular titanium dioxide adsorbent. *Chemosphere*, 60, 389–97.

- Barata, C., Baird, D. J., Nogueira, A. J. a, Agra, A. R., & Soares, A. M. V. M. (2007). Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Aquatic toxicology*, 84, 439–49.
- Baraud, F., & Leleyter, L. (2012). Prediction of phytoavailability of trace metals to plants: Comparison between chemical extractions and soil-grown radish. *Comptes Rendus Geoscience*, 344(8), 385–395.
- Barriga, S., Méndez, A., Cámara, J., Guerrero, F., & Gascó, G. (2010). Agricultural valorisation of de-inking paper sludge as organic amendment in different soils. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 99(3), 981–986.
- Beesley, L., & Dickinson, N. (2009). Carbon and trace element mobility in an urban soil amended with green waste compost. *Journal of Soils and Sediments*, 10, 215–222.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Clemente, R., Lepp, N., & Dickinson, N. (2010a). Mobility of arsenic, cadmium and zinc in a multi-element contaminated soil profile assessed by in-situ soil pore water sampling, column leaching and sequential extraction. *Environmental Pollution*, 158, 155–160.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., & Gomez-Eyles, J. L. (2010b). Effects of biochar and green waste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environmental pollution* 158, 2282–2287.
- Beesley L. & Dickinson N. (2010). Carbon and trace element mobility in an urban soil amended with green waste compost. *Journal of Soils and Sediments*. 10, 215-222.
- Beesley, L., & Marmiroli, M. (2011). The immobilisation and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar. *Environmental pollution*, 159, 474–480.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J. L., Harris, E., Robinson, B., & Sizmur, T. (2011). A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environmental pollution*, 159, 3269–3282.
- Bertocchi, A. F., Ghiani, M., Peretti, R., & Zucca, A. (2006). Red mud and fly ash for remediation of mine sites contaminated with As, Cd, Cu, Pb and Zn. *Journal of Hazardous Materials*, 134, 112–119.

- Beyer, L., Blum, H.P., Mueller, K., & Schleich-Saidfar, C. (1992). The application of secondary paper mill sludges on arable soils to improve soil fertility. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 169, 336–346
- Bissen, M., & Frimmel, F. H. (2003). Arsenic – a Review . Part I : Occurrence , Toxicity , Speciation , Mobility. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31, 9–18.
- Bleeker, P. M., Schat, H., Vooijs, R., Verkleij, J. A. C., & Ernst, W. H. O. (2003). Mechanisms of arsenate tolerance in *Cytisus striatus*. *New Phytologist*, 157, 33–38.
- Bloom, P.R. (1981). En Cehmistry i n theSoil Environment. Eds Dowdy, R.H., Ryam, J.A., Volk, V.V., & Baker, D.E. American Society of Agronomy. Meeting, Madison,WI.
- Blute, N. K., Brabander, D. J., Hemond, H. F., Sutton, S. R., Newville, M. G., & Rivers, M. L. (2004). Arsenic sequestration by ferric iron plaque on cattail roots. *Environmental Science & Technology*, 38, 6074–6077.
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., & Curtin, D. (2003). Soil acidification and liming interactions with nutrient and heavy metal transformation and bioavailability. *Advances in Agronomy*, 78, 215–272.
- Bostan, V., McCarthy, L. H., & Liss, S. N. (2005). Assessing the impact of land-applied biosolids from a thermomechanical (TMP) pulp mill to a suite of terrestrial and aquatic bioassay organisms under laboratory conditions. *Waste management*, 25, 89–100.
- Bowell, R.J. (1994). Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydroxides in soils. *Applied Geochemistry* 9, 279–286.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New phytologist*, 173, 677–702.
- Bronick, C. J., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124, 3–22.
- Brooks, R.R. (1998). Phytoremediation by volatilisation. In: Brooks, R.R. (ed) Plants that hyper-accumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining. Wallingford, UK.CAB International. pp. 289–312.

- Brown, R.A., Hicks, R.J., & Hicks, P.M (1994). Use of air sparging for in situ bioremediation. In: Hinchey RE, editor. Air sparging for site remediation. Boca Raton (FL): Lewis Publishers; pp. 38–55.
- Buckingham, S., Tipping, E., & Hamilton-Taylor, J. (2008). Dissolved organic carbon in soil solutions: a comparison of collection methods. *Soil Use and Management*, 24, 29–36.
- Burgos, P., Madejón, P., Madejón, E., Girón, I., Cabrera, F., & Murillo, J. M. (2013). Natural remediation of an unremediated soil twelve years after a mine accident: Trace element mobility and plant composition. *Journal of Environmental Management*, 114, 36–45.
- Cabrera, F., Clemente, L., Díaz Barrientos, E., López, R., & Murillo, J. M. (1999). Heavy metal pollution of soils affected by the Guadamar toxic flood. *The Science of the Total Environment*, 242, 117–129.
- Cadahía, C. Fertilización. Cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. (2005). Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Cala, V. (1995). Dinámica de metales pesados en suelos. Instituto Tecnológico GeoMinero de España, págs. 49-58
- Calace, N., Campisi, T., Iaconi, A., Leoni, M., Petronio, B. M., & Pietroletti, M. (2005). Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludges addition: chemical and ecotoxicological evaluation. *Environmental Pollution*, 136, 485–492.
- Camberato, J.J., Vance, E.D. & Someshwar, A.V. (1997) Composition and land application of paper manufacturing residuals. In: Rechcigl JE, MacKinnon HC (eds) Agricultural uses of by-products and wastes. ACS Symposium Series 668, Washington, pp 185–202.
- Cao, X., Ma, L. Q., Chen, M., Singh, S. P., & Harris, W. G. (2002). Impacts of phosphate amendments on lead biogeochemistry at a contaminated site. *Environmental Science & Technology*, 36, 5296–5304
- Cao, X, Ma, L.Q., & Shiralipour, A. (2003). Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator, *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*, 126, 157–167.

- Cao, X., & Ma, L. Q. (2004). Effects of compost and phosphate on plant arsenic accumulation from soils near pressure-treated wood. *Environmental Pollution*, 132, 435–442.
- Carbonell A.A., Aarabi M.A., DeLaune R.D, Gambrell R.P., Patrick Jr. W.H. (1998a). The influences of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil*, 198, 33-43.
- Carbonell A.A., Aarabi M.A., DeLaune R.D, Gambrell R.P., & Patrick Jr. W.H. (1998b). Arsenic in wetland vegetation: Availability, phytotoxicity, uptake and effects on plant growth and nutrition. *The Science of the Total Environment*, 217, 189-199.
- Carlson, L., Bigham, J.M., Schwertmann, U., Kyek, A., & Wagner, F. (2002). Scavenging of As form acid mine drainage by Schwertmannite and ferrihydrite: a comparison with synthetic analogues. *Environmental of Science and Technology*, 36, 1712–1719.
- Cattani, I., Capri, E., Boccelli, R., & Del Re, A. A. M. (2009). Assessment of arsenic availability to roots in contaminated Tuscany soils by a diffusion gradient in thin films (DGT) method and uptake by *Pteris vittata* and *Agrostis capillaris*. *European Journal of Soil Science*, 60, 539–548.
- CEN 12457-1:2002-04, Characterization of waste - Leaching; Compliance test for leaching of granular and sludges - Part 1: One stage batch test at a liquid to solid ration of 2l/kg with particle size below 4mm (without or with size reduction) European Committee for Standardisation.
- CEN/TS 14405:2004-06, Characterization of waste - Leaching behaviour tests - Up-flow percolation test (under specified conditions) European Committee for Standardization.
- Chaîneau, C. H., Yepremian, C., Vidalie, J. F., Ducreaux, J., & Ballerini, D. (2003). Bioremediation of a crude oil-polluted sol: Biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, Air and Soil Pollution*, 144, 419–440.
- Chander, K., Dyckmans, J., Joergensen, R., Meyer, B., & Raubuch, M. (2001). Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. *Biology and Fertility of Soils*, 34, 241–247.

- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., & Sparks, D.L. (2007). Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality*, 36, 1429–1443.
- Chapman, E. E. V., Dave, G., & Murimboh, J. D. (2012). Bioavailability as a Factor in Risk Assessment of Metal-Contaminated Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 2907–2922.
- Chen, G.Q., Zeng, G.M., Tu, X., Huang, G.H., & Chen, Y.N. (2005). A novel biosorbent: characterization of the spent mushroom compost and its application for removal of heavy metals. *Journal of Environmental Science*, 17, 756–760.
- Chen, S., Sun, L., Chao, L., Zhou, Q., & Sun, T. (2009). Estimation of lead bioavailability in smelter-contaminated soils by single and sequential extraction procedure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 82, 43–47.
- Chen, G., Liu, X., & Su, C. (2012). Distinct effects of humic acid on transport and retention of TiO₂ rutile nanoparticles in saturated sand columns. *Environmental Science & Technology*, 46, 7142–7150.
- Cheng, H., Hu, Y., Luo, J., Xu, B., & Zhao, J. (2009). Geochemical processes controlling fate and transport of arsenic in acid mine drainage (AMD) and natural systems. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 13–26.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7, 309–315.
- Clemente, R., Walker, D. J., Roig, A., & Bernal, M. P. (2003). Heavy metal bioavailability in a soil affected by mineral sulphides contamination following the mine spillage at Aznalcóllar (Spain). *Biodegradation*, 14, 199–205.
- Clemente, R., Walker, D. J., & Bernal, M. P. (2005). Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): the effect of soil amendments. *Environmental pollution*, 138, 46–58.
- Clemente, R., Almela, C., & Bernal, M. P. (2006). A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environmental Pollution*, 143, 397–406.

- Clemente, R., Dickinson, N. M., & Lepp, N. W. (2008). Mobility of metals and metalloids in a multi-element contaminated soil 20 years after cessation of the pollution source activity. *Environmental pollution*, 155, 254–261.
- Clemente, R., Walker, D. J., Pardo, T., Martínez-Fernández, D., & Bernal, M. P. (2012). The use of a halophytic plant species and organic amendments for the remediation of a trace elements-contaminated soil under semi-arid conditions. *Journal of hazardous materials*, 223-224, 63–71.
- Comunicación de la Comisión La seguridad de la minería: informe de seguimiento de los últimos accidentes ocurridos en el sector. (2000). /COM/2000/0664 final/.
- Conesa, H. M., Evangelou, M. W. H., Robinson, B. H., & Schulin, R. (2012). A critical view of current state of phytotechnologies to remediate soils: still a promising tool? *The Scientific World Journal*, Volume 2010, Article ID 173829, 10 pages.
- Cornu, J. Y. & Denaix, L. (2006). Prediction of zinc and cadmium phytoavailability within a contaminated agricultural site using DGT *Environmental Chemistry*, 3, 61–64.
- Czech, V., Czövek, P., Fodor, J., Bóka, K., Fodor, F., & Cseh, E. (2008). Investigation of arsenatephy tototoxicity in cucumber plants. *Acta Biologica Szeged*, 1, 79–80.
- Dalzell, D.J.B. (2002). A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*, 47, 535–45.
- Das, D., Samanta, G., Mandal, B. K., Chowdhury, T. R., Chanda, C. R., Chowdhury, P. P., & Basu, G. K. (1996). Arsenic in groundwater in six districts of West. *Environmental Geochemistry and Health*, 18, 5–15.
- Davis, L.C., Vanderhoof, S., Dana, J., Selk, K., Smith, K., Goplen, B., & Erickson, L.E. (1998) Movement of chlorinated solvents and other volatile organics through plants monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometry. *Journal of Hazardous Substrates and Research*, 1, 4-26.
- De Brouwere, K., Smolders, E., Merckx, R. (2004). Soil properties affecting solid-liquid distribution of As(V) in soils. *European Journal of Soil Science*, 55, 165–173.

- Declercq, I., Cappuyns, V., & Duclos, Y. (2012). Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: state of the art in Europe--a critical evaluation. *Science of the Total Environment*, 426, 393–405.
- Delhaize, E., & Ryan, P. R. (1995). Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiology*, 107, 315–321.
- Dempsey, J.M., 1975. Kenaf. In: Fiber Crops. The University Presses of Gainesville, Gainesville, FL, pp. 203-302.
- Deng, H., Li, M.S., Chen, Y.X., Luo, Y.P., & Yu, F.M. (2010). A new discovered manganese hyperaccumulator – *Polygonum pubescens* Blume. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 94–99.
- Deram, A., Petit, D., Robinson, B., Brooks, R., Gregg, P., & Van Haluwyn, C. (2000). Natural and induced heavy-metal accumulation by *Arrhenatherum elatius*: Implications for phytoremediation. *Communications in soil science and plant analysis*, 31, 413-421.
- Deram, A., Denayer, F.-O., Dubourgier, H.-C., Douay, F., Petit, D., & Van Haluwyn, C. (2007). Zinc and cadmium accumulation among and within populations of the pseudometallophytic species *Arrhenatherum elatius*: implications for phytoextraction. *The Science of the Total Environment*, 372, 372–381.
- Di Bonito, M. D., Breward, N., Crout, N., Smith, B., & Young, S. (2008). Overview of Selected Soil Pore Water Extraction Methods for the Determination of Potentially Toxic Elements in Contaminated Soils: Operational and Technical Aspects. In *Environmental Geochemistry, Site Characterization, Data Analysis and Case Histories*, Capítulo 10, pp: 213–249. Elsevier.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2000). Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, L 327/1-73.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2006). Directiva 2004/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de abril de 2004 sobre responsabilidad medioambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales, L 143, 56-75.

- Diario Oficial de la Unión Europea (2006). Directiva 2006/21/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2006 sobre la gestión de los residuos de industrias extractivas y por la que se modifica la Directiva 2004/35/CE, L 102/15-23.
- Dickinson, N.M., & Pulford, I.D. (2005) Cadmium phytoextraction using short rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environmental International*, 31, 609–613.
- Dickinson, N. M., Baker, A. J. M., Doronila, A., Laidlaw, S., & Reeves, R. D. (2009). Phytoremediation of inorganics: realism and synergies. *International Journal of Phytoremediation*, 11, 97–114.
- Dimitriou I., & P. Aronsson (2005). Sauces para energía y fitorremediación en Suecia. *Unasyuva*, 56, 47-50.
- DIN 38 414-S4 (1984). Determination of leachability by water (S4). German standard methods for the examination of water, wastewater and sludge. Sludge and sediments (group S).
- DIN 19529-01 (2009). Elution von Feststoffen - Schüttelverfahren mit einem Wasser-/Feststoffverhältnis von 2l/kg zur Untersuchung der Elution von anorganischen Stoffen für Materialien mit einer Korngröße bis 32mm- Übereinstimmungsuntersuchung (Leaching of solid materials – Batch test at a liquid to solid ratio of 2l/kg for the examination of the leaching behaviour of inorganic substances for materials with a particle size up to 32mm - Compliance test), German Standardisation Organisation.
- Dinelli, E., & Lombini, A. (1996). Metal distributions in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variation. *Applied Geochemistry*, 11, 375–385.
- Dixit, S., & Hering, J. G. (2006). Sorption of Fe(II) and As(III) on goethite in single- and dual-sorbate systems. *Chemical Geology*, 228, 6-15.
- Do Nascimento, C. W. A. do, & Xing, B. (2006). Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola*, 63, 299-311.
- Domènech, C., Ayora, C., & De Pablo, J. (2002). Sludge weathering and mobility of contaminants in soil affected by the Aznalcollar tailing dam spill (SW Spain). *Chemical Geology*, 190, 355–370.

- Domínguez, M. T., Marañón, T., Murillo, J. M., Schulin, R., & Robinson, B. H. (2008). Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: a large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution*, 152, 50–59.
- Domínguez, M. T., Marañón, T., Murillo, J. M., Schulin, R., & Robinson, B. H. (2009). Nutritional Status of Mediterranean Trees Growing in a Contaminated and Remediated Area. *Water, Air, and Soil Pollution*, 205, 305–321.
- Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15, 3–11.
- Dorn, P.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P., & Wisniewski, H.L. (1998). Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earth- worms, Microtox(R) and plants. *Chemosphere*, 37, 845–860.
- Dowdle, P.R., Laverman, A.M., Oremlan, R.S., 1996. Bacterial reduction of arsenic (V) to arsenic (III) in anoxic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1664
- Duman, F., Ozturk, F., & Aydin, Z. (2010). Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to the inorganic arsenic species As(III) and As(V): effects of concentration and duration of exposure. *Ecotoxicology*, 19, 983–993.
- Dushenkov, V., Nanda-Kumar, P.B.A., Motto, H., & Raskin I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology*, 29, 1239–1245.
- Egemen, E., Yurteri, C., 1996. Regulatory leaching tests for fly ash: a case study. *Waste Manag. Res.* 14, 43-50.
- Eisenberg, S.H., Tittlebaum, M.E., Eaton, H.C., Soroczack, M.M., 1986. Chemical characteristics of selected fly ash leachates. *J. Environ. Sci. Health A21*, 383e402.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9, 167–172.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*.

- Ernst, W. (1996). Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry*, 11, 163–167.
- Ernst, W. (2005). Phytoextraction of mine wastes – Options and impossibilities. *Chemie der Erde - Geochemistry*, 65, 29–42.
- Esteban, E., Carpena, R. O., & Meharg, A. A. (2003). High- affinity phosphate/arsenate transport in white lupin (*Lupinus albus*) is relatively insensitive to phosphate status. *New Phytologist*, 158, 165–173.
- Esteban, E., Moreno, E., Peñalosa, J., Cabrero, J.I., Millán, R., & Zornoza, P (2008). Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: kinetics and stress indicators. *Environmental & Experimental Botany*, 62, 316–322.
- European Comission. Reference Document on Best Available Techniques for Management of Tailings and Waste-Rock in Mining Activities (2009). <http://ec.europa.eu/environment/waste/mining/bat.htm>
- Feng, M. H., Shan, X. Q., Zhang, S. Z., & Wen, B. (2005). Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere*, 59, 939–949.
- Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205, 223–240.
- Fernández, M. D., Cagigal, E., Vega, M. M., Urzelai, A., Babín, M., Pro, J., & Tarazona, J. V. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 62, 174–184.
- Fernández, J., Curt, M. D., & Aguado, P. L. (2006). Industrial applications of *Cynara cardunculus*_L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products*, 24, 222–229.
- Fernando, D. R., Woodrow, I. E., Jaffré, T., Dumontet, V., Marshall, a T., & Baker, a J. M. (2008). Foliar manganese accumulation by *Maytenus founieri* (Celastraceae) in its native New Caledonian habitats: populational variation and localization by X-ray microanalysis. *New Phytologist*, 177, 178–85.

- Fitz, W. J., & Wenzel, W. W. (2002). Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, 99, 259–278.
- Fitz, W. J., Wenzel, W. W., Zhang, H., Nurmi, J., Stipek, K., Fischerova, Z., Schweiger, P., Köllensperger, Gunda, Ma, Lena Q., & Stingeder, G. (2003). Rhizosphere characteristics of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and monitoring of phytoremoval efficiency. *Environmental Science & Technology*, 37, 5008–5014.
- Fitz, W.J., Wenzel, & W.W. (2006). Sequestration of arsenic by plants. En: Naidu, R., y col. Eds. Managing Arsenic in the Environment. From Soils to Human Health. CSIRO Pub., Collingwood, Australia, pp. 209-222.
- Fontaine, S., Barot, S., Barre, P., Bdioui, N., Mary, B., & Rumpel, C. (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature*, 450, 277–280.
- Ford, K.L., & Walker, M. (2003). Abandoned Mine Waste Repositories: Site Selection, Design, and Cost. Technical Note 410. Denver, CO: Bureau of Land Management.
- Fox, B., & Walsh, C.T. (1982). Mercuric reductase. Purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation–reduction-active disulfide. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 2498–2503.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1056–1071.
- Freitas, H., Prasad, M. N. V., & Pratas, J. (2004). Analysis of serpentinophytes from north-east of Portugal for trace metal accumulation--relevance to the management of mine environment. *Chemosphere*, 54, 1625–1642.
- Frost, R.R., Griffin, R.A., 1977. Effect of pH on adsorption of arsenic and selenium from landfill leachate by clay minerals. *Soil Science Society of America Journal* 41, 53–57.
- Fuentes, A., Lloréns, M., Sáez, J., Aguilar, M. A I., Pérez-Marín, A. B., Ortuño, J. F., & Meseguer, V. F. (2006). Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. *Environmental Pollution*, 143, 355–360.

- Gadepalle, V. P., Ouki, S. K., Herwijnen, R. Van, & Hutchings, T. (2007). Immobilization of Heavy Metals in Soil Using Natural and Waste Materials for Vegetation Establishment on Contaminated Sites. *Soil and Sediment Contamination*, 16, 233–251.
- Geiger, G., Brandl, H., Furrer, G., & Schulin, R. (1998). The effect of copper on the activity of cellulase and b-glucosidase in the presence of montmorillonite or Al-montmorillonite. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1537–1544.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. C., & Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 877–887.
- Giménez, J., Martínez, M., De Pablo, J., Rovira, M., & Duro, L. (2007). Arsenic sorption onto natural hematite, magnetite, and goethite. *Journal of Hazardous Materials*, 141, 575–580.
- Glæsner, N., Donner, E., Magid, J., Rubæk, G. H., Zhang, H., & Lombi, E. (2012). Characterization of Leached Phosphorus from Soil, Manure, and Manure-Amended Soil by Physical and Chemical Fractionation and Diffusive Gradients in Thin Films (DGT). *Environmental science & Technology*, 46, 10564–10571.
- Gominho, J., Lourenço, a., Palma, P., Lourenço, M. E., Curt, M. D., Fernández, J., & Pereira, H. (2011). Large scale cultivation of *Cynara cardunculus* L. for biomass production—A case study. *Industrial Crops and Products*, 33, 1–6.
- González, R. C., & González-Chávez, M. C. A. (2006). Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 144, 84–92.
- Gräfe, M., Sparks, D.L. (2006). Solid phase speciation of arsenic. En: Naidu, R., et al.. Eds. Managing.
- Grimalt, J. O., Ferrer, M., & Macpherson, E. (1999). The mine tailing accident in Aznalcollar. *The Science of the Total Environment*, 242, 3–11.
- Grossl, P.R., Eick, M., Sparks, D.L., Goldberg, S., & Ainsworth, C.C. (1997). Arsenate and chromate retention mechanisms on goethite. 2. Kinetic evaluation using a pressure-jump relaxation technique. *Environmental Science & Technology*, 31, 321-326.

- Gulz, P. A., Gupta, S.-K., & Schulin, R. (2005). Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils. *Plant and Soil*, 272, 337–347.
- Gunes, A., Pilbeam, D. J., & Inal, A. (2009). Effect of arsenic–phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant and Soil*, 314, 211–220.
- Gupta, A. K., & Sinha, S. (2007). Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern. (var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 144–150.
- Gutiérrez, J., Hong, C. O., Lee, B.-H., & Kim, P. J. (2010). Effect of steel-making slag as a soil amendment on arsenic uptake by radish (*Raphanus sativa* L.) in an upland soil. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 617–623.
- Hadjispyrou, S., Kungolos, A., & Anagnostopoulos, A. (2001). Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 49, 179–186.
- Han, D. S., Batchelor, B., Park, S. H., & Abdel-Wahab, A. (2012). As(V) adsorption onto nanoporous titania adsorbents (NTAs): effects of solution composition. *Journal of Hazardous Materials*, 229-230, 273–281.
- Hart, J. J., Welch, R. M., Norvell, W. a, & Kochian, L. V. (2002). Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiologia plantarum*, 116, 73–78.
- Hartley, W., Edwards, R., & Lepp, N. W. (2004). Arsenic and heavy metal mobility in iron oxide-amended contaminated soils as evaluated by short- and long-term leaching tests. *Environmental Pollution*, 131, 495–504.
- Hartley, W., & Lepp, N. W. (2008). Remediation of arsenic contaminated soils by iron-oxide application, evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake. *Science of the total environment*, 390, 35–44.
- Hartley, W., Dickinson, N. M., Riby, P., & Lepp, N. W. (2009a). Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environmental pollution*, 157, 2654–2662.

- Hartley, W., Dickinson, N. M., Clemente, R., French, C., Pearce, T. G., Sparke, S., & Lepp, N. W. (2009b). Arsenic stability and mobilization in soil at an amenity grassland overlying chemical waste (St. Helens, UK). *Environmental pollution*, 157, 847–856.
- Hartley, W., Dickinson, N. M., Riby, P., Leese, E., Morton, J., & Lepp, N. W. (2010). Arsenic mobility and speciation in a contaminated urban soil are affected by different methods of green waste compost application. *Environmental pollution*, 158(12), 3560–3570.
- Hartley, W., Dickinson, N. M., Riby, P., & Shutes, B. (2012). Sustainable ecological restoration of brownfield sites through engineering or managed natural attenuation? A case study from Northwest England. *Ecological Engineering*, 40, 70–79.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Vooijs, R., Ten Bookum, W., Schat, H., & Meharg, A.A. (2001a). Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant physiology*, 126, 299–306.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., & Meharg, A. A. (2001b). Copper and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L., clones with differential sensitivity. *Plant, Cell & Environment*, 24, 713–722.
- Hartley-Whitaker, J., Woods, C., & Meharg, A. A. (2002). Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? *New Phytologist*, 155, 219–225.
- He, Y. T., Wan, J., & Tokunaga, T. (2007). Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 321–332.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated Chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acids and peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189–198.
- Heiss, S., Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C., & Rausch, T. (2003). Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1833–1839.
- Helgesen, H., & Larsen, E. H. (1998). Bioavailability and speciation of arsenic in carrots grown in contaminated soil. *The Analyst*, 123, 791–6.

- Hernández-Allica, J., Garbisu, C., Barrutia, O., & Becerril, J. M. (2007). EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 26–32.
- Hinojosa, M. B., Carreira, J. a., García-Ruíz, R., & Dick, R. P. (2004). Soil moisture pretreatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1559–1568.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., Rodríguez-Maroto, J.M., García-Ruíz, R. (2008). Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: ecological dose-response model. *Science of the Total Environment*, 396, 89–99.
- Hope, C.F.A., Burns, R.G., 1987. Activity, origins and location of cellulase in a silt loam soil. *Biol. Fert. Soils* 5, 164–170.
- Huang, R.-Q., Gao, S.-F., Wang, W.-L., Staunton, S., & Wang, G. (2006). Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, southeast China. *Science of the Total Environment*, 368, 531–541.
- ISO 6341 (1996). Water quality – determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – acute toxicity test. Geneve, Switzerland.
- ISO 11348-2 (1998). Water Quality – Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria Test). Part 2: Method Using Liquid-Dried Bacteria. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- ISO/ DIS 8692. (2002). International Standard for Water Quality: Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. International Organization for Standardisation. Geneve, Switzerland.
- ISO/DIS 17402. (2006). Soil Quality – Guidance for the Selection and Application of Methods for the Assessment of Bioavailability in Soil and Soil Materials (Draft Document). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/DIS 17512-1. (2008). Soil Quality - Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals - Test with Earthworms (*Eisenia fetida*). International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.

- ISO/TS 21268-1 (2007). Soil quality - Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials - Part 1: Batch test using a liquid to solid ratio of 2l/kg dry matter.
- ISO/TS 21268-3 (2007). Soil quality - Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials - Part 3:Up-flow percolation test.
- Izquierdo, I., Caravaca, F., Alguacil, M. M., Hernández, G., & Roldán, A. (2005). Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Applied Soil Ecology*, 30, 3–10.
- Jain, A., Loeppert, R.H., 2000. Effect of competing anions on the adsorption of arsenate and arsenite by ferrihydrite. *Journal of Environmental Quality*, 29, 1422-1430.
- Jänsch, S., Amorim, M.J., Römbke, J., 2005. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environmental Reviews* 13, 51-83.
- Jiménez R, Jordá L, Jordá R, Prado P. 2004. La minería metálica en Madrid. *Bocamina* 14.
- Jocelyn, P.C., 1987. Biochemistry of the ASH Group. Academic press. London, UK.
- Jordá, L. (2003). Breve historia de la minería de los metales en la Comunidad de Madrid. *Tierra y Tecnología*, 25, 63-68.
- Jordá, L., Puche, O., & Mazadiego L.F. (2005). La minería de los metales y la metalurgia en Madrid (1417-1983). Ed Instituto Geológico y Minero de España. Serie Recursos Minerales nº7, 192 pp.
- Kabata-Pendias, A. (2004). Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Geoderma*, 122, 143–149.
- Kabata-Pendias, A. (2010). Trace Elements in Soils and Plants. 4ed. CRC Press. Boca Raton. London, UK.
- Kaiser, K.L.E. (1998). Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environmental health perspectives*, 106, 583–591.

- Kalbitz, K., & Wennrich, R. (1998). Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Science of the Total Environment*, 209, 27–39.
- Kandeler, E., Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6, 68–72.
- Kapanen, A., & Itävaara, M. (2001). Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and environmental safety*, 49, 1–16.
- Karami, N., Clemente, R., Moreno-Jiménez, E., Lepp, N. W., & Beesley, L. (2011). Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass. *Journal of hazardous materials*, 191, 41–48.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M. P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., & Monterroso, C. (2009). Trace element behaviour at the root–soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 243–259.
- Kieken, L. (1995). Zink. In: Alloway, B.J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils*, 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- King, D. J., Doronila, A. I., Feenstra, C., Baker, A. J. M., & Woodrow, I. E. (2008). Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four Eucalyptus species: growth, arsenic uptake and availability after five years. *Science of the Total Environment*, 406, 35–42.
- Kloke, A., Sauerbeck, D.R., & Vetter, H. (1984). The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. In: Nriagu J (ed) *Changing metal cycles and human health*. Springer, Berlin, pp. 113–141.
- Knoke, K.L., Marwood, T.M., Cassidy, M.B., Liu, D., Seech, A.G., Lee, H., & Trevors, J.T. (1999). A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 110, 157–169
- Koo, N., Jo, H.-J., Lee, S.-H., & Kim, J.-G. (2011). Using response surface methodology to assess the effects of iron and spent mushroom substrate on arsenic phytotoxicity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Hazardous Materials*, 192, 381–387.

- Koo, N., Lee, S.-H., & Kim, J.-G. (2012). Arsenic mobility in the amended mine tailings and its impact on soil enzyme activity. *Environmental geochemistry and health*, 34(3), 337–348.
- Koster, M., Reijnders, L., Van Oost, N. R., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2005). Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods. *Environmental Pollution*, 133, 103–116.
- Kudłak, B., Wolska, L., & Namieśnik, J. (2011). Determination of EC50 toxicity data of selected heavy metals toward *Heterocypris incongruens* and their comparison to “direct-contact” and microbiotests. *Environmental monitoring and assessment*, 174, 509–516.
- Krysiak, A., & Karczewska, A. (2007). Arsenic extractability in soils in the areas of former arsenic mining and smelting, SW Poland. *The Science of the total environment*, 379(2-3), 190–200. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.09.031
- Krzaklewski, W., & Pietrzykowski, M. (2002). Selected physico-chemical properties of zinc and lead ore tailings and their biological stabilisation. *Water Air & Soil Pollution*, 141, 125–142.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., & Maurice, C. (2008). Stabilization of As, Cr , Cu , Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management*, 28, 215–225.
- Kungolos, A., Hadjispyrou, S., Petala, M., Tsiridis, V., Samaras, P., & Sakellaropoulos, G. P. (2004). Toxic Properties of Metals and Organotin Compounds and Their Interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 4, 101–110.
- Ladd, J.N., & Butler, J.H.A. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4, 19–30.
- Laird, D., Fleming, P., Wang, B., Horton, R., & Karlen, D. (2010). Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil. *Geoderma*, 158, 436–442.
- Lakshminathiraj, P., Narasimhan, B. R. V, Prabhakar, S., & Bhaskar Raju, G. (2006). Adsorption studies of arsenic on Mn-substituted iron oxyhydroxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 304, 317–322.
- Landberg, T., & Greger, M. (1996). Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Applied Geochemistry*, 11, 175–180.

- Landberg, T., & Greger, M. (2004). No phytochelatin (PC2 and PC3) detected in *Salix viminalis*. *Physiologia Plantarum*, 121, 481–487.
- Lee, D. A., Chen, A., & Schroeder, J. I. (2003). Ars1, an Arabidopsis mutant exhibiting increased tolerance to arsenate and increased phosphate uptake. *The Plant Journal*, 35, 637–646.
- Lehto, N. J., Davison, W., Zhang, H., & Tych, W. (2006). Theoretical comparison of how soil processes affect uptake of metals by diffusive gradients in thin films and plants. *Journal of environmental quality*, 35, 1903–1913.
- Leitgib, L., Kálmán, J., & Gruiz, K. (2007). Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, 66, 428–34.
- Leroy, B.L.M., Herath, H.M.S.K., Sleutel, S., De Neve, S., Gabriels, D., Reheul, D., & Moens, M. (2008). The quality of exogenous organic matter: short-term effects on soil physical properties and soil organic matter fractions. *Soil Use and Management*, 24, 139-147.
- Lessl, J. T., Ma, L. Q., Rathinasabapathi, B., & Guy, C. (2013). Novel Phytase from *Pteris vittata* Resistant to Arsenate, High Temperature, and Soil Deactivation. *Environmental science & technology*, 47, 2204–2211.
- Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. Boletín Oficial del Estado nº 181
- Lin, Z., & Puls, R. W. (2000). Adsorption, desorption and oxidation of arsenic affected by clay minerals and aging process. *Environmental Geology*, 39, 753–759.
- Lin, H. T., Wang, M. C., & Seshiah, K. (2008). Mobility of adsorbed arsenic in two calcareous soils as influenced by water extract of compost. *Chemosphere*, 71, 742-749.
- Lindsay, W.L., & Norvell, W.A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421–428.
- Lindsay, W.L., 1979. Chemical Equilibria in Soils. Wiley-Interscience, New York.
- Liu, M.-Q., Yanai, J., Jiang, R.-F., Zhang, F., McGrath, S. P., & Zhao, F.-J. (2008). Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? *Chemosphere*, 71, 1276–1283.

- Liu, W.-J., Wood, B. A., Raab, A., McGrath, S. P., Zhao, F.-J., & Feldmann, J. (2010). Complexation of arsenite with phytochelatins reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152, 2211–2221.
- Llugany, M., Miralles, R., Corrales, I., Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2012). *Cynara cardunculus* a potentially useful plant for remediation of soils polluted with cadmium or arsenic. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 122–127.
- Lombi, E., Wenzel, W. W., & Adriano, D. C. (1998). Soil contamination, risk reduction and remediation. *Land Contamination and Reclamation*, 6, 183-197.
- Lombi, E., Zhao, F. J., Dunham, S. J., & McGrath, S. P. (1999). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of environmental quality*, 30, 1919–26.
- López, E. (2007). Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Loureiro, S., Soares, A. M. V. M., & Nogueira, A. J. A. (2005). Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental pollution*, 138, 121-131.
- Lövei, G. L. (2001). Ecological Impacts of GMOs. Ecological risks and benefits of transgenic. *New Zealand Plant Protection*, 54, 93–100.
- Lozano-Rodríguez, E., Luguera, M., Lucena, J.J., & Carpena-Ruiz, R.O. (1995). Evaluation of two different acid digestion methods in closed systems of trace elements determination in plants. *Química Analítica*, 14, 27–30.
- Luo, Y.M., Christie, P., & Baker, A.J. (2000). Soil solution Zn and pH dynamics in non-rhizosphere soil and in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* grown in a Zn/Cd-contaminated soil. *Chemosphere*, 41,161-164.
- Ma, L.Q., Komar, K.M.M., Tu, C., W. Zhang, Cai, Y., & Kennelley, E. D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409, 579.

- Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.-Y., Su, Y.-H., McGrath, S. P., & Zhao, F.-J. (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 9931–9935.
- Macur, P.E., Wheeler, J.T., McDermott, T.R., & Inskeep W.P. (2001). Microbial population associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings, *Environmental Science & Technology*, 35, 3676-3682.
- Madejón, P., Murillo, J. M., Marañón, T., Cabrera, F., & López, R. (2002). Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *The Science of the total environment*, 290, 105-20.
- Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J. M., & Robinson, B. (2004). White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental pollution*, 132, 145-55.
- Madejón, P., & Lepp, N. W. (2007). Arsenic in soils and plants of woodland regenerated on an arsenic-contaminated substrate: a sustainable natural remediation? *The Science of the total environment*, 379, 256-262.
- Madejón, E., Murillo, J. M., Moreno, F., López, M. V., Arrue, J. L., Alvaro-Fuentes, J., & Cantero, C. (2009). Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil and Tillage Research*, 105, 55-62.
- Madejón, P., Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Cabrera, F., Lepp, N. W., & Madejón, E. (2010). Do amended, polluted soils require re-treatment for sustainable risk reduction? — Evidence from field experiments. *Geoderma*, 159, 174-181.
- Manahan S.E. (2010). Soil and agricultural environmental chemistry. In: Environmental Chemistry. Ed: CRC Press. Boca Raton.
- Manning, B.A, Hunt, M. L., Amrhein, C., & Yarmoff, J. a. (2002). Arsenic(III) and arsenic(V) reactions with zerovalent iron corrosion products. *Environmental Science & Technology*, 36, 5455–5461.

- Manzano, R., Peñalosa, J. M., & Esteban, E. (2013). Arsenic accumulation and tolerance of *Cytisus scoparius* under controlled conditions. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224, 1363.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (1994) Madrid (Spain). Métodos oficiales de análisis: Tomo III. Secretaría General Técnica.
- Martínez-Fernández, D., & Walker, D. J. (2011). The Effects of Soil Amendments on the Growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in Heavy Metal-Contaminated Soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 63-72.
- Marwood, T. M., Knoke, K., Yau, K., Suchorski-Tremblay, A., Flemming, C. A., Hodge, V., Liu, D. L., Seech, A. G., Lee, H. & Trevors, J. T. (1998) .Comparison of Toxicity Detected by Five Bioassays During Bioremediation of Diesel Fuel-Spiked Soils. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 13, 117–126.
- Mascher R., Lippmann B., Holzinger S., & Bergman H. (2002). Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*. 163, 961-969.
- Mason S., McNeill, A., Zhang, Y., McLaughlin M.J., & Guppy, C. (2012). Application of Diffusive Gradients in Thin-films (DGT) to measure potassium and sulphur availability in agricultural soils. Australian Society of Agronomy. 2012 16th AAC.
- Masscheleyn, P., Delaune, R.D., Patrick Jr., W.H. (1991). Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environmental Science & Technology*, 25, 1414–1419.
- McGrath, S.P., Sanders, J.R. and Shalaby, M.H. (1988). The effects of soil organic matter levels on soil solution concentrations and extractabilities of manganese, zinc and copper. *Geoderma*, 42, 177-188.
- McGrath, S. P., Zhao, F. J., & Lombi, E. (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil*, 232, 207-214.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., & Cook, N. (2000). Soil testing for heavy metals. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 31, 1661-700.

- Meers, E., Du Laing, G., Unamuno, V., Ruttens, a., Vangronsveld, J., Tack, F. M. G., & Verloo, M. G. (2007a). Comparison of cadmium extractability from soils by commonly used single extraction protocols. *Geoderma*, 141(3-4), 247-259.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F. M. G., Ruttens, a., Vandeghehuchte, M., Vangronsveld, J., & Verloo, M. G. (2007b). Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 385-396.
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J., & Tack, F. (2007c). Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 57-68.
- Meharg, A. A., & Macnair, M. R. (1992). Suppression of high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus Lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*, 249, 519-524.
- Meharg, A. A., & Macnair, M. R. (1994). Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. in their tolerance to arsenite. *Plant and Soil*, 162, 99-106.
- Meharg, A. A., Naylor, J., & Macnair, M. R. (1994). Phosphorus nutrition of arsenate-tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. *Journal of Environmental Quality*, 23, 234-238.
- Meharg, A., Osborn, D., Pain, D. J., Sanchez, A., & Naveso, M. A. (1999). Contamination of Doñana food-chains after the Aznalcóllar mine disaster. *Environmental Pollution*, 105, 387-390.
- Meharg, A.A., & Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species. *New Phytologist*, 154, 29-43.
- Mench, M., Bussi, S., Boisson, J., Castaing, E., Ruttens, A., Koe, T. D., Bleeker, P., Assunção A., & Manceau, A. (2003). Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in situ treatments. *Plant and Soil*, 249, 187-202.

- Mench, M., Renella, G., Gelsomino, A., Landi, L., & Nannipieri, P. (2006). Biochemical parameters and bacterial species richness in soils contaminated by sludge-borne metals and remediated with inorganic soil amendments. *Environmental pollution* 144, 24–31.
- Méndez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Review. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments-An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116, 278-283.
- Mendoza-Cózatl, D. G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J. W., Komives, E. a, Kehr, J., & Schroeder, J. I. (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal*, 54, 249–259.
- Mendoza-Cózatl, D. G., Jobe, T. O., Hauser, F., & Schroeder, J. I. (2011). Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 554–562.
- Menzies, N. W., Donn, M. J., & Kopittke, P. M. (2007). Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental pollution*, 145, 121-130.
- Merkle, S.A. (2006). Engineering forest trees with heavy metal resistance genes. *Silvae Genetica*, 55, 263-268.
- Mertens, J., Vervaeke, P., De Schrijver, A., & Luyssaert, S. (2004). Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *The Science of the total environment*, 326, 209-215.
- Mertens, J., Luyssaert, S., & Verheyen, K. (2005). Use and abuse of trace metal concentrations in plant tissue for biomonitoring and phytoextraction. *Environmental Pollution*, 138, 1–4.
- Mestrot, A., Feldmann, J., Krupp, E. M., Hossain, M. S., Roman-Ross, G., & Meharg, A. A. (2011). Field fluxes and speciation of arsines emanating from soils. *Environmental Science & Technology*, 45, 1798-1804.
- Miranda, A. F. P., Rodrigues, J. M. L., Barata, C., Riva, C., Nugegoda, D., & Soares, A. M. V. M. (2010). The use of *Daphnia magna* immobilization tests and soil microcosms to evaluate the toxicity of dredged sediments. *Journal of Soils and Sediments*, 11, 373–381.

- Miretzky, P., & Cirelli, A. F. (2010). Remediation of Arsenic-Contaminated Soils by Iron Amendments: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40, 93-115.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J. M., Esteban, E., & Carpena-Ruiz, R. O. (2007). Mercury accumulation and resistance to mercury stress in *Rumex induratus* and *Marrubium vulgare* grown in perlite. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(4), 485–494.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J. M., Carpena-Ruiz, R. O., & Esteban, E. (2008). Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere*, 71, 466–473.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J. M., Esteban, E., & Bernal, M. P. (2009). Feasibility of arsenic phytostabilisation using Mediterranean shrubs: impact of root mineralisation on As availability in soils. *Journal of Environmental Monitoring*, 11, 1375–1380.
- Moreno Jiménez, E. (2010). Tesis doctoral. Plant-based methods for remediating arsenic-polluted mine soils in Spain.
- Moreno-Jiménez, E., Manzano, R., Esteban, E., & Peñalosa, J. (2010a). The fate of arsenic in soils adjacent to an old mine site (Bustarviejo, Spain): mobility and transfer to native flora. *Journal of Soils and Sediments*, 10, 301-312.
- Moreno-Jiménez E, Esteban E, Fresno T, et al. (2010b) Hydroponics as a valid tool to assess arsenic availability in mine soils. *Chemosphere* 79:513–517.
- Moreno-Jiménez, E., Beesley, L., Lepp, N. W., Dickinson, N. M., Hartley, W., & Clemente, R. (2011). Field sampling of soil pore water to evaluate trace element mobility and associated environmental risk. *Environmental Pollution*, 159, 3078-3085.
- Moreno-Jiménez, E., Esteban, E., Carpena-Ruiz, R. O., Lobo, M. C., & Peñalosa, J. M. (2012). Phytostabilisation with Mediterranean shrubs and liming improved soil quality in a pot experiment with a pyrite mine soil. *Journal of Hazardous Materials*, 201-202, 52-59.
- Mulligan, C. N., & Yong, R. N. (2004). Natural attenuation of contaminated soils. *Environment international*, 30, 587-601.

- Naidu, R., Kookana, R. S., Sumner, M. E., Harter, R. D., & Tiller, K. G. (1997). Cadmium Sorption and Transport in Variable Charge Soils: A Review. *Journal of Environment Quality*, 26, 602–617.
- Natal da Luz, T. N., Ribeiro, R., & Sousa, J. P. (2004). Avoidance tests with Collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2188–2193.
- Natal-da-Luz, T., Amorim, M. J. B., Römbke, J., & Sousa, J. P. (2008). Avoidance tests with earthworms and springtails: defining the minimum exposure time to observe a significant response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 545–551.
- Natal-da-Luz, T., Tidona, S., Jesus, B., Morais, P. V., & Sousa, J. P. (2009). The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. *Journal of Soils and Sediments*, 9, 246–260.
- National Research Council NRC. (1993) In situ bioremediation: when does it work? Washington (DC): National Academic Press.
- Neff, J.C., & Asner, G.P. (2001) Dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: synthesis and a model. *Ecosystems*, 4, 29-48.
- Netherlands Standardisation Institute NEN 7343, February 1995. Leaching Characteristics of Solid Earthy and Stony Building and Waste Materials. Leaching Tests. Determination of the Leaching of Inorganic Components from Granular Materials with the Column Test, first ed., 11 pp.
- Nolan, A. L., Zhang, H., & McLaughlin, M. J. (2005). Prediction of zinc, cadmium, lead and copper bioavailability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin films, extraction, and isotope dilution techniques. *Journal of Environmental Quality*, 34, 496-507.
- Novak, J.M., Busscher, W.J., Laird, D.L., Ahmedna, M., Watts, D.W., & Niandou, M.A.S. (2009). Impact of biochar amendment on fertility of a southeastern coastal plain soil. *Soil Science*, 174, 105-112.

- Obbard, J. P. (2001). Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amended soils. *Applied Geochemistry*, 16, 1405–1411.
- Oliver, M. A. (1997). Soil and human health : a review, 1851, 573–592.
- O'Neill, P. (1990) Arsenic. En: Alloway BJ (ed) Heavy metals in soils. Blackie, London, pp 83–99.
- Orden 2770/2006, 11 agosto. Orden por la que se procede al establecimiento de niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos contaminados de la comunidad de Madrid. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid.
- Organization for Economic Cooperation and Development OECD. 207 (1984). Guideline for Testing of Chemicals, N 208, Earthworm, Acute Toxicity Test.
- Padrtova, R.R., Marsalek, B., & Holoubek I. (1998). Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. *Chemosphere*, 37, 495-507.
- Palma, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M. V. M., & Barbosa, I. R. (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 485-489.
- Palma, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., Bohn, A., Soares, A.M.V.M., & Barbosa, I.R (2009). Embryo-toxic effects of environmental concentrations of chlorpyrifos on the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1714-1718.
- Palma, P., Alvarenga, P., Palma, V., Matos, C., Fernandes, R. M., Soares, A., & Barbosa, I. R. (2010). Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research International*, 17, 703-716.
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A.-M., Poulsen, V., Jourdain, M.-J., Féraud, J.-F., Grand, C., & Bispo, A. (2006). Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the Total Environment*, 363, 114-125.

- Pardo, T., Clemente, R., & Bernal, M. P. (2011). Effects of compost, pig slurry and lime on trace element solubility and toxicity in two soils differently affected by mining activities. *Chemosphere*, 84, 642-650.
- Park, J. H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N., & Chung, J.W. (2011). Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *Journal of hazardous materials*, 185, 549-574.
- Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environmental International*, 32, 265-268.
- Pastor, N., López-Lázaro, M., Tella, J. L., Baos, R., Hiraldo, F., & Cortés, F. (2001). Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana Ecological Disaster. *Mutagenesis*, 16, 219-23.
- Peer, W. A., Baxter, I. R., Richards, E. L., Freeman, J. L., & Murphy, S. (2006). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Topics in Current Genetics*, 14, 299-340.
- Pérez-de-Mora, A., Ortega-Calvo, J. J., Cabrera, F., & Madejón, E. (2005). Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 28, 125–137.
- Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Cabrera, F., & Madejón, E. (2006a). Trace elements availability and plant growth in a mine-spill-contaminated soil under assisted natural remediation, part I. soils. *Science of the Total Environment*, 363, 28-37.
- Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaeckel, P., & Schlöter, M. (2006b). Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 327-341.
- Pérez-Esteban, J., Escolástico, C., Moliner, A., & Masaguer, A. (2013). Chemical speciation and mobilization of copper and zinc in naturally contaminated mine soils with citric and tartaric acids. *Chemosphere*, 90, 276–83.

- Personne, G. 1999. THAMNOTOXKIT FTM - Crustacean toxicity screening test for Freshwater. Standard Operational Procedure. Belgium. pp 3-21.
- Peuke, A. D., & and Rennenberg, H. (2005). Phytoremediation. *EMBO Reports*, 6, 497-501.
- Phan, C.-W., & Sabaratnam, V. (2012). Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 863-873.
- Pickering, I. J., Prince, R. C., George, M. J., Smith, R. D., George, G. N., & Salt, D. E. (2000). Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. *Plant Physiology*, 122, 1171-1177
- Pigna, M., Cozzolino, V., Violante, A., & Meharg, A. a. (2008). Influence of Phosphate on the Arsenic Uptake by Wheat (*Triticum durum* L.) Irrigated with Arsenic Solutions at Three Different Concentrations. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197, 371-380.
- Prasad, M.N.V., & Freitas, H. (2003). Metal hyperaccumulation in plants biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 275-321.
- Prohaska, T., Pfeffer, M., Tulipan, M., Stinger, G., Mentler, A., & Wenzel, W. W. (1999). Speciation of arsenic of liquid and gaseous emissions from soil in a microcosmos experiment by liquid and gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 364, 467-470.
- Pueyo, M., López-Sánchez, J.F., & Rauret, G. (2004). Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soil. *Analytica chimica acta*, 504, 217-26.
- Raskin, I., Smith, R., & Salt, D. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 221-226.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. (2003). *BOE nº 45*, pp. 7228-7245.
- Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. *BOE 15*, de 18 de enero de 2005.

- Real Decreto 824/2005, de 8 de Julio, sobre productos fertilizantes. (2005). *BOE nº 171*, pp. 25592-25669.
- Real Decreto 975/2009, de 12 de junio, sobre gestión de los residuos de las industrias extractivas y de protección y rehabilitación del espacio afectado por actividades mineras. (2009). *BOE nº 143*, pp. 49948-49993
- Real Decreto 865/2010, de 2 de julio, sobre sustratos de cultivo (2010). *BOE nº 170*, pp. 61831-61859.
- Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. (2011). *BOE nº 19*, pp. 6854-6870.
- Reichman, S. M. (2002). The Responses of Plants to Metal Toxicity : A review focusing on Copper , Manganese and Zinc. *Australian minerals & energy environment foundation*, 14, 1–54.
- Renella, G., Landi, L., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Pietramellara, G., Mench, M., & Nannipieri, P. (2008). Long-term effects of aided phytostabilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environmental Pollution*, 152, 702-712.
- Renoux, A. Y., Tyagi, R. D., & Samson, R. (2001). Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water research*, 35, 1415-1424.
- Renoux, A. Y., Rocheleau, S., Sarrazin, M., Sunahara, G. I., & Blais, J.-F. (2007). Assessment of a sewage sludge treatment on cadmium, copper and zinc bioavailability in barley, ryegrass and earthworms. *Environmental Pollution*, 145, 41-50.
- Ribo, J.M., & Kaiser, K. L. (1983). Effects of selected chemical to *Photoluminiscent bacteria* and their correlatiopns with acute and sublethal effects on other organisms. *Chemosphere*, 12, 1421-1442.
- Riehm, H., 1958. Die ammoniumlaktatessigsäure-methode zur bestimmung der leichtloeslichen phosphosäure in karbonathaltigen boden. *Agrochimica* 3, 49– 65.
- Ritter, W. F., McDermott, J. G., & Chirnside, A. E. M. (1992). Use of paper mill residuals as soil amendments. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 23, 469-88.

- Robinson, B., Schulin, R., Nowack, B., Roulier, S., Menon, M., Clothier, B., Green, S., & Mills, T. (2006). Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *Forest Snow and Landscape Research*, 80, 221-234.
- Robinson, B. H., Bañuelos, G., Conesa, H. M., Evangelou, M. W. H., & Schulin, R. (2009). The phytomanagement of trace elements in soil. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28, 240-266.
- Ross, S.M. (1994) Toxic Metals in Soil-Plant Systems. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- Ruyters, S., Mertens, J., Vassilieva, E., Dehandschutter, B., Poffijn, A., & Smolders, E. (2011). The Red Mud Accident in Ajka (Hungary): Plant Toxicity and Trace Metal Bioavailability in Red Mud Contaminated Soil. *Environmental Science & Technology*, 45, 1616-1622.
- Sadiq, M. (1997). Arsenic chemistry in soils: An overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water, Air, & Soil Pollution*, 93, 117-136.
- Salisbury, F.B., & Ross, C.W. (1978). The Photosynthesis-Transpiration Compromise. In *Plant Physiology*, 2nd Ed.; Belmont, CA. Wadsworth Publishing Company Inc.
- Sanchez-Viveros, G., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2011). Short-term effects of arsenate-induced toxicity on growth, chlorophyll and carotenoid contents, and total content of phenolic compounds of *Azolla filiculoides*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 217, 455–462.
- Sastre-Conde, I., Cabezas, J. G., Guerrero, A., Vicente, M. A., & Lobo, M. D. C. (2007). Evaluation of the soil biological activity in a remediation soil assay using organic amendments and vegetal cover. *Science of the Total Environment*, 378, 205-208.
- Saterbak, A., Toy, R., Wong, D.C.L., McMain B.J., Williams, M.P., Dorn, P.B., Brzuzy, L.P., Chai, E.Y., & Salanitro, J.P. (1999). Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 18, 1591-1607.
- Schmöger, M. E., Oven, M., & Grill, E. (2000). Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology*, 122, 793-801.
- Schwartz, C., Morel, J. L., Saumier, S., Whiting, S. N., & Baker, A. J. M. (1999). Root development of the Zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant and Soil*, 208, 103–115.

- Schwartz, C., Gérard, E., Perronnet, K., & Morel, J. L. (2001). Measurement of in situ phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a former smelter site. *Science of the Total Environment*, 279, 215–221.
- Seth, C. S. (2011). A Review on Mechanisms of Plant Tolerance and Role of Transgenic Plants in Environmental Clean-up. *The Botanical Review*, 78, 32–62.
- Shaibur, M. R., & Kawai, S. (2009). Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 65–70.
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2009). Phytomining: A review. *Minerals Engineering*, 22, 1007–1019.
- Shipley, H. J., Engates, K. E., & Guettner, A. M. (2010). Study of iron oxide nanoparticles in soil for remediation of arsenic. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 2387–2397.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K., & Arora, K. (2007). Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*, 53, 65–73.
- Six, L., Pypers, P., Degryse, F., Smolders, E., & Merckx, R. (2012). The performance of DGT versus conventional soil phosphorus tests in tropical soils - An isotope dilution study. *Plant & Soil*, 359, 267–279.
- Smedley, P., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17, 517–568.
- Smilde, K.W., Van Luit, B., Van Driel, W. (1992). The extraction by soil and absorption by plants of applied zinc and cadmium plant and soil. *Plant & Soil*, 143, 233–238.
- Smith, E., Naidu, R., & Alston, A.M. (1999). Chemistry of arsenic in soils. I. Sorption of arsenate and arsenite by four Australian soils. *Journal of Environmental Quality*, 28, 1719–1726.
- Sneddon, J., Clemente, R., Riby, P., & Lepp, N. W. (2009). Source-pathway-receptor investigation of the fate of trace elements derived from shotgun pellets discharged in terrestrial ecosystems managed for game shooting. *Environmental Pollution*, 157, 2663–2669.

- Sneller, F. E. C., Herrewaarden, L. M. V., Kraaijeveld-Smit, F. J. L., Bookum, W. M. T., Koevoets, P. L. M., Schat, H., & Verkleij, J. A. C. (1999). Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phytologist*, *144*, 223-232.
- Sobral, O., Chastinet, C., Nogueira, A., Soares, A.M.V.M., Goncalves, F., & Ribeiro, R. (2001). *In vitro* development of parthenogenetic eggs: A fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *50*, 174-179.
- Song, J., Zhao, F.-I., Luo, Y.-M., McGrath, S.P., & Zhang, H. (2004). Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*, *128*, 307-315.
- Stankovic, S., Kalaba, P., & Stankovic, A.R. (2013). Biota as toxic metal indicators. *Environmental Chemistry Letters*.
- Stewart, M.A., Jardine, P.M., Barnett, M.O., Mehlhorn, T.L., Hyde, L.K., & McKay, L.D. (2003). Influence of soil geochemical and physical properties on the sorption and bioaccessibility of chromium (III). *Journal of Environmental Quality*, *3*, 129-137.
- Stewart, C.E., Paustian, K., Conant, R.T., Plante, A.F., & Six, J. (2008). Soil carbon saturation: Evaluation and corroboration by long-term incubations. *Soil, Biology & Biochemistry*, *40*, 1741-1750.
- Strawn, D., Doner, H., Zavarin, M., & Mchugo, S. (2002). Microscale investigation into the geochemistry of arsenic, selenium, and iron in soil developed in pyritic shale materials. *Geoderma*, *108*, 237 – 257.
- Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Mickelson, S.H., Bigham, J.M. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2 – Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 775– 833.
- Talukder, A. S. M. H. M., Meisner, C. A., Sarkar, M. A. R., Islam, M. S., Sayre, K. D., Duxbury, J. M., & Lauren, J. G. (2012). Effect of water management, arsenic and phosphorus levels on rice in a high-arsenic soil-water system: II. Arsenic uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *80*, 145-151.

- Tandy, S., Healey, J. R., Nason, M. a, Williamson, J. C., & Jones, D. L. (2009). Remediation of metal polluted mine soil with compost: co-composting versus incorporation. *Environmental pollution*, 157, 690-697.
- Tandy, S., Mundus, S., Zhang, H., Lombi, E., Frydenvang, J., Holm, P.E., & Husted, S. (2012). A new method for determination of potassium in soils using diffusive gradients in thin films (DGT). *Environmental Chemistry*, 9, 14-23.
- Tang, Y-C., Wu, C-N., Huang, X-H., Zhang, H-P., Yu, H-Q., Li, X., & Peng, Y. (2012). Arsenic(III) removal from low-arsenic water by adsorption with amorphous mesoporous TiO₂. *Desalination and water treatment*, 49, 1-3.
- Tanzarella, C., Degrassi, F., Cristaldi, M., Moreno, S., Lascialfari, A., Chiuchiarelli, G., & Ieradi, L. A. (2001). Genotoxic damage in free-living Algerian mouse (*Mus spretus*) after the Coto Doñana ecological disaster. *Environmental Pollution*, 115, 43-48.
- Tao, Y., Zhang, S., Jian, W., Yuan, C., & Shan, X. (2006). Effects of oxalate and phosphate on the release of arsenic from contaminated soils and arsenic accumulation in wheat. *Chemosphere*, 65, 1281–1287.
- Temminghoff, E.J.M., Van der Zee, S.E.A.T.M., & Da Haan, F.A.M. (1998). Effects of dissolved organic matter on the mobility of copper in a contaminated sandy soil. *European Journal of Soil Science* 49, 617-628.
- Thies, J.E., & Rillig, M.C. (2009). Characteristics of biochar: biological properties. In: Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), *Biochar for Environmental Management*. Earthscan, U.S.A.
- Tiensing, T., Preston, S., Strachan, N., & Paton, G. I. (2001). Soil solution extraction techniques for microbial ecotoxicity testing: a comparative evaluation. *Journal of Environmental Monitoring*, 3, 91-96.
- Tournassat, C., Charlet, L., Bosbach, D., & Manceau, A. (2002). Arsenic(III) oxidation by birnessite and precipitation of manganese(II) arsenate. *Environmental science & technology*, 36, 493–500.

- Trepanier, L., Gallichand, J., Caron, J., & Theriault, G. (1998). Environmental effects of deinking sludge application on soil and soil water quality. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 41, 1279-1287.
- Tsiridis, V., Petala, M., Samaras, P., Hadjispyrou, S., Sakellaropoulos, G., & Kungolos, A. (2006). Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 158-167.
- Tu, C., & Ma, L. Q. (2005). Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*, 135, 333-340.
- Tu, C., Ma, L. Q., & Bondada, B. (2002). Plant and Environment Interactions Arsenic Accumulation in the Hyperaccumulator Chinese Brake and Its Utilization Potential for Phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, 31, 1671-1675.
- Tůma, I., Holub, P., & Fiala, K. (2009). Soil nutrient heterogeneity and competitive ability of three grass species (*Festuca ovina*, *Arrhenatherum elatius* and *Calamagrostis epigejos*) in experimental conditions. *Biologia*, 64(4), 694–704.
- Turpeinen, R., Panssar-Kallio, M., & Kairesalo, T. (2002). Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. *Science of the Total environment*, 285, 133–45.
- USEPA (1999). Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storage tank sites. OSWER Directive Number 9200.4-17P. Washington (DC): Office of Solid Waste and Emergency Response.
- USEPA (2004a). Environmental Protection Agency Abandoned Mine Lands Team. Reference Notebook.
- USEPA (2004b). Abandoned Mine Lands Team: Reference Notebook. <http://www.epa.gov/aml/tech/refntbk.htm>

- Van der Lelie, D., Schwitzguebel, J. P., Glass, D. J., Vangronsveld, J., & Baker, A. J. M. (2001). Assessing phytoremediation's progress in the United States and Europe. *Environmental Science of Technology*, 446A-452A.
- Van Gestel, C. a, van der Waarde, J. J., Derksen, J. G., van der Hoek, E. E., Veul, M. F., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., & Stokman, G.N.M. (2001). The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental toxicology and chemistry*, 20, 1438-1449.
- Van Goor, B.J., & Wiersma, D. (1976). Chemical forms of manganese and zinc in phloem exudates. *Physiology Plantarum*, 36, 213.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D., & Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 765-794.
- Vázquez, S., & Carpena-Ruiz, R. (2005). Use of perlite in cadmium plant studies: an approach to polluted soil conditions. *Journal of Environmental Monitoring*, 7, 1355–1358.
- Vázquez, S., Esteban, E., & Goldsbrough, P. (2005). Arsenate-induced phytochelatins in white lupin: influence of phosphate status. *Physiologia Plantarum*, 124, 41-49.
- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M. J., Esteban, E., Peñalosa, J. M., & Carpena, R. O. (2006). Use of White Lupin Plant for Phytostabilization of Cd and As Polluted Acid Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 177(1-4), 349–365.
- Vázquez, S., Moreno, E., & Carpena, R. O. (2008). Bioavailability of metals and As from acidified multicontaminated soils: use of white lupin to validate several extraction methods. *Environmental geochemistry and health*, 30, 193-198.
- Vázquez, S., Hevia, A., Moreno, E., Esteban, E., Peñalosa, J. M., & Carpena, R. O. (2011). Natural attenuation of residual heavy metal contamination in soils affected by the Aznalcóllar mine spill, SW Spain. *Journal of Environmental Management*, 92, 2069-2075.
- Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 364–372.

- Vervaeke, P, Luyssaert S, Mertens J, Meers E, Tack FMG, & Lust, N. (2003). Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environmental Pollution*, 126(2), 275–282
- Visser, S., & Parkinson, D. (1992). Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7, 33-37.
- Voegelin, A., Tokpa, G., Jacquat, O., Barmettler, K. & Kretzschmar, R. (2008). Zinc fractionation in contaminated soils by sequential and single extractions: influence of soil properties and zinc content. *Journal of Environmental Quality*, 37, 1190–1200.
- Wai Mun, H.O., Hoe A.L., & Don Koo, L. (2008) Assessment of Pb uptake, translocation and immobilization in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) for phytoremediation of sand tailings. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 1341-1347.
- Walker, F. P., Schreiber, M. E., & Rimstidt, J. D. (2006). Kinetics of arsenopyrite oxidative dissolution by oxygen. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 1668–1676.
- Wang, J., Zhao, F., Meharg, A. A., Raab, A., Feldmann, J., & McGrath, S. P. (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology*, 130, 1552-1561.
- Wang, S., & Mulligan, C. N. (2006a). Natural attenuation processes for remediation of arsenic contaminated soils and groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 138, 459-470.
- Wang, S., & Mulligan, C. N. (2006b). Effect of natural organic matter on arsenic release from soils and sediments into groundwater. *Environmental Geochemistry and Health*, 28, 197-214.
- Wang, L., & Duan, G. (2009). Effect of external and internal phosphate status on arsenic toxicity and accumulation in rice seedlings. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 346-351.
- Wang, S., & Mulligan, C. N. (2009). Enhanced mobilization of arsenic and heavy metals from mine tailings by humic acid. *Chemosphere*, 74, 274-279.
- Warhurst A. (2000). Mining, mineral processing, and extractive metallurgy: an overview of the technologies and their impact on the physical environment. In: *Environmental Policy in Mining: Corporate Strategy and Planning for Closure*. Warhurst A, Noronha L, eds. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.

- Waychunas, G. A., Kim, C. S., & Banfield, J. F. (2005). Nanoparticulate Iron Oxide Minerals in Soils and Sediments: Unique Properties and Contaminant Scavenging Mechanisms. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 409–433.
- Wellburn, A. (1994). The spectral determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313
- Wenzel, W.W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingeder, G., Lombi, E., & Adriano, D.C., 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analitica Chimica Acta*, 436, 309-323.
- White, G.A., Gardner, J.C., & Cook, C.G. (1994). Biodiversity for industrial crop development in the USA. *Industrial Crops and Products*, 2, 259-272.
- Whitehead, D.C. (2000). 'Nutrient Elements in Grasslands: Soil-Plant-Animal Relationships.' CABI Publishing, Wallingford.
- Whiting, S. N., Leake, J. R., McGrath, S., & Baker, A. J. M. (2000). Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 145, 199–210.
- Williams, P. N., Zhang, H., Davison, W., Zhao, S., Lu, Y., Dong, F., Zhang, L., & Pan, Q. (2012). Evaluation of in Situ DGT Measurements for Predicting the Concentration of Cd in Chinese Field-Cultivated Rice: Impact of Soil Cd:Zn Ratios *Environmental science & technology*, 46, 8009-8016.
- Wolska, L., Sagajdakow, A., Kuczyńska, A., & Namieśnik, J. (2007). Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 332-344.
- Wong, M. H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Ecological Restoration*, 50, 775-780.
- Woolson, E.A., (1973). Arsenic phytotoxicity and uptake in six vegetable crops. *Weed Science*, 21, 524–527.

- Xu, X. Y., McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2007). Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *The New Phytologist*, 176, 590–599.
- Xu, Y., & Zhao, D. (2007). Reductive immobilization of chromate in water and soil using stabilized iron nanoparticles. *Water research*, 41, 2101–2108.
- Xue, S.G., Chen, Y.X., Reeves, R.D., Baker, A.J.M., & Lin, Q., Fernando, D.R. (2004) Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Environmental Pollution*, 131, 393–399.
- Ye, W.-L., Wood, B. A., Stroud, J. L., Andralojc, P. J., Raab, A., McGrath, S. P., Feldmann, J., et al. (2010). Arsenic speciation in phloem and xylem exudates of castor bean. *Plant physiology*, 154, 1505–1513.
- Yin Chan, K. & Xu, Z., (2009). Biochar: nutrient properties and their enhancement. En: Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), Biochar for Environmental Management. Earth- scan, EEUU.
- Zar J (1999) Biostatistical Analysis. 4th Edition Prentice-Hall, Inc, pp. 931.
- Zhang, H., Davison, W., Knight, B., & McGrath, S. (1998). In Situ Measurements of Solution Concentrations and Fluxes of Trace Metals in Soils Using DGT. *Environmental Science & Technology*, 32, 704-710.
- Zhang, H., Zhao, F. J., Sun, B., Davison W. & McGrath, S. P. (2001). A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science of Technology*, 35, 2602-2607.
- Zhang, H. & Selim, H.M.. (2008). Reaction and transport of arsenic in soils: equilibrium and kinetic modeling, *Advances in Agronomy*, 98, 45-115.
- Zhang, J., Zhao, Q. Z., Duan, G. L., & Huang, Y. C. (2011). Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedling. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 34–40.
- Zhao, F. J., Wang, J. R., Barker, J. H. A., Schat, H., Bleeker, P. M., & McGrath, S. P. (2003). The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*, 159, 403-410.

- Zhao, F. J.; Rooney, C. P.; Zhang, H. & McGrath, S. P. (2006). Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 733-742.
- Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A.A., & McGrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New phytologist*, 181, 777-794.
- Zhao, F.-J., McGrath, S. P., & Meharg, A. A. (2010). Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual review of Plant Biology*, 61, 535–559.
- Zhuravel, E. V, Markina, Z. V, & Aizdaicher, N. A. (2012). Influence of water pollution on the growth and pigment concentration of the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta). *Environmental Monitoring & Assessment*, 184, 2909-2919.